

BAND 27, HEFT 1

JULI 1956

# PHYTOPATHOLOGISCHE ZEITSCHRIFT

Begründet von Prof. Dr. E. Schaffnit

*Unter Mitwirkung von*

Prof. Dr. E. Baldacci, Mailand / Prof. Dr. H. Braun, Bonn / Prof. Dr. W. B. Brierley,  
Keswick-Cumberland / Prof. Dr. T. Hemmi, Kyoto / Oberreg.-Rat i. R. Dr. E. Köhler,  
Braunschweig / Prof. Dr. K. O. Müller, Canberra / Prof. Dr. H. M. Quanjér, Wageningen  
Prof. Dr. Tr. Savulescu, Bukarest / Prof. Dr. E. C. Stakman, St. Paul

*herausgegeben von den Professoren*

**E. Gäumann**  
Zürich

**M. Klinkowski**  
Aschersleben

**H. Richter**  
Berlin-Dahlem



Mit 84 Abbildungen

1956

PAUL PAREY IN BERLIN UND HAMBURG

*Phytopath. Z. Bd. 27, Heft 1, S. 1—116, Berlin 1956*



## I N H A L T

### Abhandlungen

RIGGENBACH, A., Untersuchung über den Eschenkrebs. Mit 41 Abb. ....	1
SGANZERLA, M., Ricerche sulla patogenicità e sull'epidemia di <i>Botrytis gladiolorum</i> nei gladioli. 15 figure .....	41
KERN, H., Der Einfluß des Lycomarasmin-Kupfer-Komplexes auf den Wasserhaushalt abgeschnittener Tomatensprosse. Mit 3 Abb. ....	55
GARAY, A. St., Studies on the effect of ergot infection on rye and on toxic substances in the sclerotium. With 17 figures .....	60
HUBER, J., Untersuchungen über die schädigende Wirkung des Rhizoctoniabefalles der Kartoffelstaude. Mit 5 Abb. ....	73
BEISS, U., Untersuchungen über den Wirtspflanzenbereich des Vergilbungsvirus der Beta-Rüben ( <i>Corium Betae</i> ) .....	83
BODE, O. und PAUL, H. L., Elektronenmikroskopische Untersuchungen über Kartoffelviren. III. Vermessungen an Teilchen des Kartoffel-Y-Virus. Mit 3 Abb. ..	107
TERRIER, Ch., A propos de <i>Lophodermium pinicola</i> Tehon .....	113
Besprechungen .....	116

**Manuskripte:** In deutscher, englischer, französischer oder italienischer Sprache abgefaßte Originalarbeiten werden druckfertig und möglichst in Schreibmaschinenschrift erbeten. Aufnahme von Tabellen und Abbildungen unterliegt jeweils vorheriger Vereinbarung.

„Kurze Mitteilungen“ sind solche Veröffentlichungen in den vorerwähnten Sprachen, die im allgemeinen einen Umfang von vier Druckseiten nicht übersteigen. Sie erscheinen möglichst schon im nächsten Heft.

Die „Besprechungen“ erscheinen nur in deutscher Sprache.

**Herausgeber:** Prof. Dr. E. Gäumann, Zürich 6, Universitätsstraße 2, Prof. Dr. M. Klinkowski, Aschersleben, Ermslebener Str. 52, und Prof. Dr. H. Richter, Berlin-Dahlem, Königin-Luise-Str. 19.

Zusendung der Manuskripte von Originalarbeiten und „Kurzen Mitteilungen“ entweder an den Verlag Paul Parey, Berlin SW 68, Lindenstraße 44/47, oder an einen der drei Herausgeber.

Zusendung der „Besprechungen“ unmittelbar an Prof. Richter, Berlin-Dahlem. Soweit nicht eine Aufforderung der Herausgeber zur Besprechung bestimmter Arbeiten ergangen ist, empfiehlt es sich, Prof. Richter vorher von der Absicht der Besprechung zu verständigen.

**Honorierung:** Das Mitarbeiterhonorar für Originalarbeiten und „Kurze Mitteilungen“ beträgt 32,— DM je Druckbogen von 16 Seiten. Bei Beiträgen von mehr als drei Bogen werden nur die ersten drei Bogen honoriert; Dissertationen und Buchbesprechungen sind honorarfrei.

**Sonderdrucke:** Jeder Mitarbeiter erhält unberechnet 20 Sonderdrucke seines Beitrages (Originalarbeiten und Kurze Mitteilungen). Mehrbedarf gegen Berechnung.

**Erscheinungsweise:** Die Zeitschrift erscheint in zwangloser Folge. Jährlich erscheinen etwa 10—12 Hefte, von denen 4 einen Band bilden. Jeder Band enthält etwa 30 Druckbogen.

**Bezugsbedingungen:** Der Preis des Bandes richtet sich nach dem Umfang. Er beträgt je Druckbogen von 16 Seiten etwa 3,— DM. Die Hefte sind auch einzeln käuflich. Das Abonnement verpflichtet zum Bezug eines ganzen Bandes. Es verlängert sich jeweils, falls nicht spätestens unverzüglich nach Eingang der letzten Lieferung des berechneten Bandes Abbestellung erfolgt.

Abonnementspreis dieses Heftes 24,— DM

Einzelpreis 26,40 DM



Aus dem Institut für spezielle Botanik der Eidgenössischen Technischen  
Hochschule in Zürich

Direktor: Prof. Dr. E. Gäumann

## Untersuchung über den Eschenkrebs

Von

A. RIGGENBACH

Mit 41 Abbildungen

Inhalt: Einleitung und Problemstellung. — 1. Kapitel. Der Eschenkrebs. § 1. Geschichte und Literatur. § 2. Das Krankheitsbild. § 3. Andere Krankheiten mit ähnlichen Symptomen. A. Die Eschenrose. B. Klunker. C. Weitere Krankheiten. § 4. Das Untersuchungsmaterial. § 5. Das Krebsgewebe. A. Anatomischer Bau. B. Nachweis der Mikroorganismen in den kranken Geweben. § 6. Die Mikroorganismen. A. Isolierung und Bestimmung der Mikroorganismen. B. Die Verteilung der Mikroorganismen im Krebs. C. Die Mikroorganismen aus Krebsen verschiedener Fundorte. — 2. Kapitel. Die Mikroorganismen *in vitro*. § 1. Methoden. A. Chemikalien und Nährlösungen. B. pH-Messung. C. Impfmateriel. D. Nachweis biologisch aktiver Stoffe. § 2. *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* (BROWN) DOWSON. A. Wachstum und Toxinbildung *in vitro*. B. Aufarbeitung der toxinhaltigen Kulturfiltrate. C. Wirkung des Toxins. § 3. *Fusarium lateritium* NEES. A. Allgemeines. B. Wachstum und Toxinbildung *in vitro*. § 4. *Pleospora herbarum* (PERSOON) RABENHORST. § 5. *Plenodomus Rabenhorstii* PREUSS. § 6. Die vier Mikroorganismen in Mischkultur. A. Mischkulturen zwischen *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* und einem Pilze. B. Mischkulturen zwischen *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* und mehreren Pilzen. C. Mischkulturen der Pilze. D. Besprechung der Ergebnisse. — 3. Kapitel. Die Infektionsversuche. § 1. Allgemeines. § 2. Methode. § 3. Ergebnisse. — Zusammenfassung. — Literaturverzeichnis.

### Einleitung und Problemstellung

Als Erreger des Eschenkrebses wird in der Literatur *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* (Brown) Dowson (z. B. VAN VLIET, 1931; BROWN, 1932; DOWSON, 1943) aufgeführt. Bei unseren Untersuchungen zeigte es sich jedoch, daß auch noch andere Mikroorganismen an seinem Zustandekommen beteiligt sind.

Als hauptsächlichste assoziierte Mikroorganismen konnten drei Pilze:

*Fusarium lateritium* Nees

*Pleospora herbarum* (Persoon) Rabenhorst

*Plenodomus Rabenhorstii* Preuss.

isoliert und identifiziert werden.

Die Arbeit soll einige Zusammenhänge zwischen einer pflanzlichen Primär- und Sekundärinfektion zu klären versuchen.

1. Welches sind die Erreger und die Begleitflora des Eschenkrebses?
2. Wie verhalten sich die einzelnen Mikroorganismen bei verschiedenen Umweltsbedingungen?
3. Wie gestalten sich Infektionen mit diesen Organismen?
4. Bestehen zwischen diesen Mikroorganismen bestimmte Beziehungen?

## 1. KAPITEL

### Der Eschenkrebs

#### § 1. Geschichte und Literatur

Zum erstenmal wird der Eschenkrebs durch SORAUER (1874) in seinem Atlas der Pflanzenkrankheiten erwähnt. 1893 widmet NOACK dieser Krankheit eine erste ernsthafte Studie. Er kommt dabei zum Schluß, daß der Eschenkrebs eine Bakterienkrankheit sei, da in Krebsquerschnitten Bakterien Schleim festgestellt wurde. Er glaubte, in diesen Bakterien den Erreger zu finden, eine Auffassung, die auch von SORAUER (1908) übernommen wurde. VUILLEMIN (1896) vergleicht in seiner Arbeit den Ölbaumkrebs mit dem Eschenkrebs. Er identifizierte als erster die Erreger — Bakterien — dieser beiden Pflanzenkrankheiten. VUILLEMIN war überzeugt, daß beide Krebse durch den gleichen Erreger, durch *Bacillus oleae* (Arcang) Trevis, hervorgerufen würden. Er gibt auch mutmaßliche Angaben über das Zustandekommen der Infektionen und weist auf eine eventuelle Mitwirkung von Insekten hin. *Bacillus oleae* (Arcang) Trevis ist synonym zu *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini*.

E. F. SMITH verneint 1905 die Identität des Ölbaumkrebs- und Eschenkrebs-Bakteriums und betrachtet sie als verschiedene Arten. In einer weiteren Arbeit (1913) behandelt er den Eschenkrebs-Erreger als Varietät des Ölbaumkrebs-Erregers. Während C. O. SMITH (1922) die beiden Erreger wieder als zwei verschiedene Arten trennt, sieht BROWN (1932) im Erreger des Eschenkrebses eine Varietät des Ölbaumkrebsbakteriums. Es gelangen ihm erfolgreiche Infektionsversuche an Eschen.

VAN VLIET (1931) behandelt vor allem die Morphologie des Eschenkrebses. Er unterscheidet drei Typen von Krebsen:

1. Warzenkrebse
2. eingesunkene Krebse
3. Übergangsformen von 1. und 2.



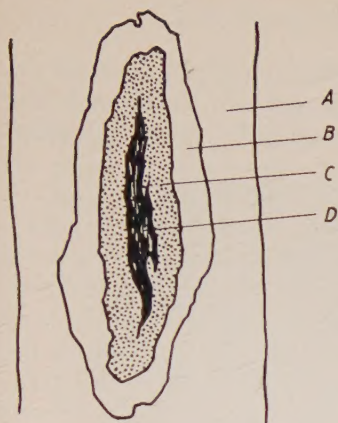


Abb. 1. Aufsicht eines Krebsgeschwürs der Esche (schematisch).  
Erklärung im Text

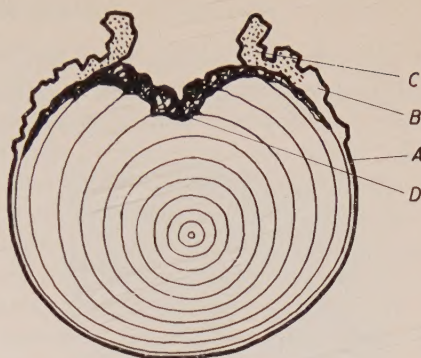


Abb. 2. Querschnitt eines Krebsgeschwürs der Esche (schematisch). Erklärung im Text



Abb. 3 (oben links). Eschenkrebs im Anfangsstadium. Der Krebs durchbricht erst an wenigen Stellen die Rinde.  
Fundort: „Im Aegerten“. Nat. Größe.  
Phot. Inst. ETH

Abb. 4 (unten links). Eschenkrebs an einem dreijährigen Stämmchen.  
Fundort: Buchenegg. 1,5fach vergrößert

Abb. 5 (rechts). Eschenkrebs an einem vierjährigen Stämmchen.  
Fundort: „Im Aegerten“. Nat. Größe.  
Phot. Inst. ETH

## § 2. Das Krankheitsbild

Als erstes äußerliches Anzeichen einer Krebserkrankung zeigt sich bei der europäischen Esche, *Fraxinus excelsior*, eine oft rötliche Verfärbung der Rinde. An Stämmen und Ästen erscheinen später rundliche, meist aber elliptische Flecke mit Längsachse in der Stammrichtung. Ihre Farbe ist heller als die der sie umgebenden Rinde. Diese hellen Stellen vergrößern sich, und zugleich erhebt sich das Zentrum über die Umgebung, um dann in einer oder mehreren Längsspalten von unterschiedlicher Breite aufzureißen. Bei weiterem Wachstum des Fleckes, das sowohl in der Richtung der Stammachse, als auch in die Breite erfolgt, erscheinen neue Längsrisse. Sie verbreitern sich, und schwarzes, verkorktes Gewebe dringt heraus. In ungleich großen Lücken, die durch Auflösung von Zellen entstanden sind, findet sich ein stark mit Bakterien durchsetzter Schleim. Rund um die wulstigen Ränder dieser offenen Wunden ist die aufgerissene Rinde gelblich bis rötlich verfärbt. Auf diese Weise entsteht ein Krebs, bei dem wir äußerlich vier Zonen unterscheiden (Abb. 1 und 2):

- A. Gesunde, unverfärbte Rinde über gesundem Holz.
- B. Verfärbung im Kambium und in den Rindengeweben, schwache Aufwölbung.
- C. Stark, zum Teil vom Holz losgelöste, aufgewölbte Rinde, beginnende Risse.
- D. Offener Spalt, Rinde fehlt, Holz schwarz.

Die photographischen Aufnahmen (Abb. 3 bis 7), welche die natürlichen Farbkontraste kaum zum Ausdruck bringen, zeigen diese Zonen nur undeutlich.



Abb. 6

Abb. 7

Abb. 6. Eschen-  
krebs an einem  
achtjährigen  
Stamm.  
Fundort:  
Steg im Tösstal.  
1,5fach vergr.

Abb. 7. Eschen-  
krebs an einem  
zwölfjährigen  
Stamm.  
Fundort:  
Hirzegg.  
1,5fach vergr.



### § 3. Andere Krankheiten mit ähnlichen Symptomen

#### A. Die Eschenrose

Eschenrose und Eschenkrebs wurden ihrer großen Ähnlichkeit wegen häufig miteinander in Beziehung gebracht.



Abb. 8. Eschenrose an einem  
17jährigen Eschenstamm.  
Fundort: Teufen. Nat. Größe



Abb. 9 Klunker. Durch die Eschengallmilbe deformierte Blütenstände.  
Fundort: Boncourt (Ajoie)  $\frac{2}{3}$  nat. Gr.

Die Eschenrosen (Abb. 8) entwickeln sich als Folge des Überwinterungsfraßes, nicht aber des Brutfraßes des Eschenbastkäfers, *Hylesinus fraxini* (FRANK, 1896; ESCHERICH, 1923; SCHNEIDER-ORELLI, 1947). Diese Rindenwucherungen, bei denen das Kambium nicht zerstört wird (EICHHOFF, 1881), erhielten 1868 von RATZBURG den euphemistischen Namen „Eschenrose“. Die ältere Literatur bezeichnet sie realer als „Käfergrind“.

#### B. Klunker

Die Eschengallmilbe, *Eriophyes fraxinivorus*, verwandelt die Blütenstände der Esche in blumenkohlartige Massen, Klunker (SCHNEIDER-ORELLI, 1947) (Abb. 9).

#### C. Weitere Krankheiten

Die Esche wird noch von vielen anderen tierischen Schädlingen, vor allem Milben, Läusen und Borkenkäfern befallen. Die entstehenden Schäden sind jedoch bei uns in der Regel unbedeutend und unauffällig.

Außer den Mikroorganismen des Eschenkrebses sind auf der europäischen Esche noch eine Vielzahl pflanzlicher Parasiten nachgewiesen (OUDEMANS, 1923). Sie verursachen aber weder größere Schäden noch absonderliche, eschenkrebsähnliche Mißbildungen.

#### § 4. Das Untersuchungsmaterial

Die für diese Untersuchungen benötigten krebskranken Eschen stammen aus dem Kanton Zürich. Die Namen der Standorte wurden dem Topographischen Atlas der Schweiz 1 : 25 000, die Hinweise auf den Boden der Geologischen Karte des Kantons Zürich und der Nachbargebiete, 1 : 150 000 (SUTER, 1939), entnommen.

Zu vielem Dank bin ich Herrn Prof. Dr. H. LEIBUNDGUT am Institut für Waldbau der E. T. H. verpflichtet, der mich auf das Problem aufmerksam machte und mir auch bei der Beschaffung des zugrunde liegenden Materials behilflich war.

Die Fundorte sind:

##### 1. Teufen

Die Waldungen am Irchel weisen viele Eschenflächen in jedem Alter auf. Der Eschenkrebs ist stellenweise häufig, so im Junkerntal, 550 m ü. M., beim Schlosse Teufen. Der Boden, obere Süßwassermolasse, ist gut. An den Waldrändern zeigt sich Eschenrosenbefall.

##### 2. Regensberg

Am Nordhang der Lägern bei Regensberg, in den Waldparzellen „Im Bann“ und „Im Süniker Weidgang“, 700 m ü. M., stehen viele stark krebskranke Eschen verschiedenen Alters. Das auf der Schattenseite der Längern liegende Gelände ist besonders in Muldenlagen feucht; stellenweise tritt die nackte Felsunterlage, Malm, zutage.

##### 3. Rümlang

Zwischen Oberglatt und Rümlang, in der Nähe der Grundwasserweiher und der Gießen des alten Glattlaufes, stehen vereinzelte Eschen. Einige dieser fünf- bis zwölfjährigen Bäume sind vom Eschenkrebs befallen. Die Krankheit tritt nur vereinzelt auf. Der Alluvialboden liegt 420 m ü. M.

##### 4. Bassersdorf

Im „Berg“ bei Bassersdorf, bei den „Römerweihern“ und in „Widem“, 500 m ü. M., stehen ältere Eschen mit Eschenrosenbefall, vor allem in den lichterem Waldpartien. In „Widem“ wächst auf nassem Moränenschutt der Würmeiszeit ein dichter Tannenforst, durchsetzt mit Eschenflächen. Sowohl diese angefliegenen, dichtstehenden, kümmerlichen Eschen als auch die schön wachsenden im benachbarten Flurbezirk „Längetsholz“ sind stark krebskrank.

##### 5. Katzenrüti

Krebskranke Eschen wachsen im Wald zwischen Regensberg und Watt, im „Oberem Hirscheeren“, 500 m ü. M. Die einzelnen Parzellen des Privatwaldes zeigen einen unterschiedlichen Baumbestand. Die angefliegenen Eschen sind sowohl im Alter als auch im Wuchs ganz verschieden. Der Boden, obere



Süßwassermolasse ohne Moränenbedeckung, ist sumpfig; an mehreren Stellen tritt Sickerwasser zutage.

An den krebskranken Eschen finden sich keine Eschenrosen, wohl aber an anderen, nicht krebskranken Eschen, die, ungefähr 100 m entfernt auf trockenem Boden stehend, den Waldrand bilden.

#### 6. Aegerten

Das Waldstück „Im Aegerten“ gehört zum Lehrrevier der ETH und liegt auf der Nordseite des Uetliberges, 775 m ü. M. Es bildet eine flache, nach Norden geöffnete Mulde mit sumpfigem Würmmoränenboden. Die Eschen sind nicht gepflanzt, sie wachsen frei, als Anflug, in einem Tannenschlag. Von einigen Säuberungen abgesehen, sind sie sich selbst überlassen.

#### 7. Mädikon

In der Nähe des Gutes Mädikon, am Nordhang des Albisgrates, „Im Leiterli“, 740 m ü. M., stehen auf unterer Süßwassermolasse vereinzelte krebskranke Eschenbäumchen.

#### 8. Entlisberg

Dieser Standort krebskranker Eschen liegt am Entlisberg an einer nach Südwesten steil gegen die Sihl abfallenden Halde, 470 m ü. M. Der aus oberer Süßwassermolasse bestehende Hang weist viele Sickerwasseraustritte auf und ist zu Rutschungen geneigt. Neben den Eschen wachsen Fichten (*Picea abies*) und Eiben (*Taxus baccata*). In unmittelbarer Nähe stehende Eschen zeigen wohl starken Eschenrosenbefall, aber keinen Krebs.

#### 9. Buchenegg

Dieser Bestand von krebskranken Eschen liegt im „Großholz“ am Sträßchen von der vorderen Buchenegg zum Albispaß, 850 m ü. M. Der Boden, Moränenschutt der Rißeiszeit, ist nicht zu feucht. Die Eschen wachsen sehr dicht und sind sechs bis acht Jahre alt.

#### 10. Steg

Eschenkrebskranke Eschen finden sich bei Steg im Tößtal im „Burgstall“, 870 m ü. M., am Weg zum Schnebelhorn. Die Eschen wachsen auf Nagelfluh. Der Krebsbefall ist mäßig.

#### 11. Hirzegg

Die Hirzegg, im Gebiete des Schnebelhorns, liegt 1100 m ü. M. Die erkrankten Eschen wachsen vereinzelt in sumpfigen Nagelfluhmulden. Vor allem ältere Bäume weisen an Stämmen und Ästen Krebsstellen auf.

#### 12. Schnebelhorn

Im Walde unterhalb des Gipfels des Schnebelhorns, 1250 m ü. M., stehen auf Nagelfluh krebskranke Eschen. Vorwiegend sind es ältere Bäume, die noch teilweise mit Eschenrosen behaftet sind.



Der Eschenkrebs findet sich somit an zahlreichen Stellen über große Teile des Kantons Zürich verbreitet (Abb. 10). Dabei werden besonders Eschen an schlechten Standorten (feuchte Böden, Dickungen usw.) häufig befallen.

Abb. 10.  
Übersicht der Fundstellen von Eschenkrebs im Kanton Zürich

- |               |                  |
|---------------|------------------|
| 1. Teufen     | 7. Mädikon       |
| 2. Regensberg | 8. Entlisberg    |
| 3. Rümlang    | 9. Buchenegg     |
| 4. Basserdorf | 10. Steg         |
| 5. Katzenrüti | 11. Hirzegg      |
| 6. Aegerten   | 12. Schnebelhorn |

## § 5. Das Krebsgewebe

### A. Anatomischer Bau

Zur mikroskopischen Untersuchung wurden die Krebsstücke drei bis vier Wochen in eine Glycerin-Alkohol-Lösung (1 Teil Äthylalkohol abs., 1 Teil Glycerin) eingelegt und mit dem Holzmikrotom geschnitten. Wird das Holz nur mit Wasser durchtränkt und gekocht, so trennt sich beim Schneiden die Rinde vom Holz, da das Kambium zerstört wird. Beim Durchtränken mit der Glycerin-Alkohol-Lösung ist dies selten der Fall. Die Schnitte können in 70 % Alkohol aufbewahrt werden.

Die mikroskopische Betrachtung des Krebsgewebes zeigt Veränderungen im Bau der Rindengewebe. Diese werden mehr parenchymatisch, das Sklerenchym verschwindet. Die sich im Verlaufe der Krankheit bildenden Korkschichten verlaufen ungefähr parallel zum Kambium. Korknachweis durch Färbung mit *Gentianaviolett* (SCHNEIDER-ZIMMERMANN, 1922; CIBA, 1940). VAN VLIET (1931) vermutet, daß die bei der Korkbildung auftretenden Spannungen zur Zerreißung der Gewebe und somit zur mechanischen Bildung von Höhlungen führen. Im Gegensatz dazu führt NOACK (1893) diese Lücken, die mit Bakterien angefüllt sind, auf die Tätigkeit der Bakterien zurück. Diese beiden Vorgänge schließen einander nicht aus; sie dürften gemeinsam zur Bildung der Höhlungen beitragen. Die Korkschichten werden wohl zum Abschluß des erkrankten Gewebes vom gesunden angelegt und stellen eine Abwehrreaktion des Wirtes dar (GÄUMANN, 1951).



Die Korkschichten vermögen jedoch die Ausbreitung der Krankheit lediglich zu verzögern, nicht aber zu verhindern.

In der Nähe des Krankheitsherdes verbreitern sich die Jahrringe.

## B. Der Nachweis der Mikroorganismen in den kranken Geweben

### 1. Nachweis der Bakterien

Durch Färbung der Schnitte mit Methylenblau können in Zellen und Hohlräumen Bakterien nachgewiesen werden. Stark mit Bakterien durchsetzte Schleimmassen finden sich in allen Teilen der braun oder schwarz verfärbten Gewebepartien der Rinde und des Holzes. Die Bakterien dringen am weitesten im Kambium und in den direkt anliegenden Zellschichten der Rinde und des Holzes vor (Abb. 11).

### 2. Nachweis der Pilze

Die beste und sicherste Methode, Pilzhyphe im Holze festzustellen, ist die Färbung mit Baumwollblau (Methylwasserblau, BAVENDAMM 1936).

Methode: Es werden zwei Lösungen A und B benötigt:

Lösung A:	Phenol	50 g	Lösung B:	Lösung A
	Milchsäure	50 g		mit 1 g
	Glyzerin	50 ml		Baumwollblau.
	Wasser dest.	100 ml		

Die Schnitte werden während 5 Min. mit der Lösung A durchtränkt und anschließend in der Lösung B gefärbt. Die Färbedauer richtet sich nach dem Objekt und beträgt 2—3 Min. Die überschüssige Farbe wird mit der Lösung A ausgewaschen. Bei erfolgreicher Färbung wird das Holzgewebe nur schwach, die Pilzhyphe dagegen leuchtend dunkelblau gefärbt. Mit der Baumwollblau-Färbung lassen sich, ausgenommen in den äußersten Partien (in Abb. 12 bei A), in allen Teilen des Krebsgewebes, auch in und zwischen



Abb. 11. Verteilung der Bakterien im Krebsgeschwür (schematisch). Die von Bakterien besiedelten Stellen sind punktiert

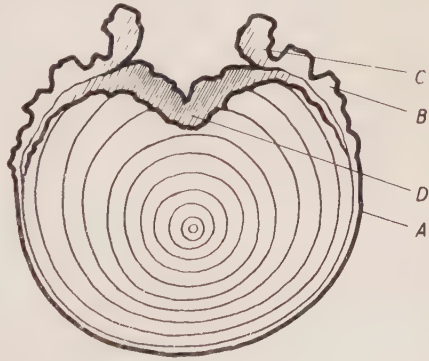


Abb. 12. Verteilung der Pilze im Krebsgeschwür (schematisch). Die von Pilzen besiedelten Stellen sind schraffiert

den Zellen des noch kaum verfärbten Holzes, Pilzhypen nachweisen. Zwischen jungen und alten Krebsen besteht in der Durchdringung des Gewebes mit Pilzhypen kein Unterschied. Praktisch finden sich in allen Partien, die Bakterien aufweisen, auch Pilzfäden. Ihre Dichte ist jedoch im Zentrum am größten und nimmt gegen den Rand des Krankheitsherdes ab.

## § 6. Die Mikroorganismen

### A. Isolierung und Bestimmung der Mikroorganismen

#### 1. Methode

Das Holzstück, aus dem die Mikroorganismen isoliert werden sollen, wird zur Entfernung aller äußerlich anhaftenden Keime mit einer 2 ‰ Sublimatlösung ( $\text{HgCl}_2$ ) behandelt. Im Impfkasten werden unter sterilen Bedingungen alle sichtbar verfärbten, braunschwarzen Stellen weggeschnitten. Das Holzstück wird nochmals kurz in die 2 ‰ Sublimatlösung getaucht und anschließend dreimal während 5 Min. in je 300 ml sterilem Wasser gewaschen. Aus dem Gewebe werden von verschiedenen Stellen 20 kleine Würfelchen,  $4 \times 4 \times 1$  mm, herausgeschnitten und je 4 auf eine Malzagarplatte gelegt, die in einem Wärmeschrank bei  $24^\circ \text{C}$  bebrütet wird. Von jedem Fundort werden mindestens zehn verschiedene Krebse, womöglich von mehreren Bäumen, untersucht.

4—5 Tage nach der Beimpfung der Platten beginnen die Mikroorganismen — Pilze und Bakterien — aus dem Holze heraus auf die Platten zu wachsen. Die Bakterien erscheinen um die Holzprobe herum auf der Agar-Oberfläche als feine, gelbe Punkte. Die Pilze bilden zuerst auf dem Holze einen feinen, weißen Myzellaum, der später auf den Agar hinüberwächst.

#### 2. Bakterienreinkulturen

Die Bakterienkulturen wurden in Gelatineverdünnungsreihen hergestellt.

Methode: Von verschiedenen Bakterienkolonien eines Fundortes werden kleine Stücke ausgestochen und in sterilem Wasser suspendiert. Die Suspension wird durch sterile Watte filtriert und 1 ml in 9 ml flüssige Nährgelatine gegeben. Von diesen 10 ml wird 1 ml zu neuen 9 ml Nährgelatine pipettiert, und so werden 25 bis 30 Verdünnungsstufen hergestellt. Die Nährgelatine der einzelnen Stufen wird in Platten gegossen, die bei Zimmertemperatur im Dunkeln bebrütet werden.

In den letzten fünf bis zehn Verdünnungsstufen sind die Kolonien so weit voneinander entfernt, daß sie gut im Mikroskop betrachtet und isoliert werden können. Es zeigte sich, daß praktisch alle Kolonien gleich ausgebildet waren, sowohl in Form als auch in Farbe. Die Kolonien verflüssigen die Gelatine nicht. Sie sind rund, mit einem scharfen, leicht gekerbten Rande. Ihre Farbe ist weiß bis leicht gelblich. Einzelne dieser



Kolonien wurden für weitere Versuche auf Nähragar nach MEYER (1903) abgeimpft.

### 3. Pilzreinkulturen

Die Mehrzahl der Pilzreinkulturen konnte durch Überimpfen von wenig Myzel auf neue Malzagarplatten erhalten werden. Waren diese Kolonien mit Bakterien verunreinigt, so wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt.

**Methode:** Wenig abgeschabtes Myzel einer Kolonie wird in 10 ml sterilem Wasser suspendiert und 1 ml dieser Aufschwemmung für die Verdünnungsreihe verwendet. Jede Verdünnung wird für 30 Minuten auf eine Malzagarplatte gegossen. Die nach wenigen Tagen sichtbaren Kolonien werden auf neue Platten übertragen. Die Kulturen wurden auf Malz- oder Bierwürzeagar aufbewahrt. Auf Bierwürze wachsen die Kulturen üppiger und bilden, im Gegensatz zu den Malzagarkulturen, mehr Pigment.

Nach durchschnittlich zehn Tagen sind die Bakterien und Pilze auf allen Platten gut entwickelt. Solange sich die Kolonien nicht gegenseitig durchwachsen, können die einzelnen Mikroorganismen isoliert werden. Die Pilze unterscheiden sich durch verschieden gefärbte Myzelien. Hemmungen zwischen einzelnen Kolonien konnten keine beobachtet werden.

### 4. Die Bestimmung der Pilze

Zur Bestimmung der Myzelien und zur Gewinnung von Impfmaterial war es notwendig, Fruchtformen der Pilze zu erhalten.

Die Fruktifikation vieler Pilze kann durch Verschlechterung der Lebensbedingungen (GÄUMANN, 1949) gefördert werden. Die Pilze wurden auf verschiedenen Nährsubstraten gezogen, wie Malzagar, Reis, Weizenstroh und Eschensägemehl. Weizenstroh und Eschensägemehl wurden mit destilliertem Wasser, Brunnenwasser oder Knopscher Nährlösung, mit und ohne Zusatz von Hoagland A—Z (FREY-WYSSLING, 1949), aufgeschwemmt. Auf Weizenstroh, vor allem aber auf Eschensägemehl, ist das Wachstum schlecht; nach Monaten bildeten sich nur vereinzelte Konidienlager. Malzagar und Reis dagegen ermöglichen ein üppiges Myzelwachstum mit starker Konidienbildung.

**Filterpapiermethode:** Ein umgekehrter Faltenfilter wird mit der Nährlösung in einem Erlenmeyerkolben sterilisiert. Der Pilz wächst nicht im Nährmedium, sondern auf dem Filter. Als Nährlösung wurden:

Brunnenwasser

Knop

Knop + 1 ml/l Hoagland A—Z

verwendet. Die Zellulose des Filterpapiers diente als C-Quelle.



Abb. 13. Konidienlager einer Tageslichtkultur von *Pleospora herbarum* auf Filterpapier mit Knopscher Nährlösung.

$\frac{2}{3}$  nat. Größe

Diese Methode ergab die besten Ergebnisse. Die Zahl der Konidienlager ist bei allen Pilzen in den Brunnenwasserkulturen am kleinsten. Auf Knop ohne Zusatz von Hoagland A—Z ist sie im allgemeinen, besonders bei *Pleospora herbarum* (Persoon) Rabenhorst, am größten. Bei allen Tageslichtkulturen ist die Zahl der Konidienlager größer als bei den Dunkelkulturen.

Zusammen mit Dr. E. MÜLLER konnten die Pilze an Hand der Konidienformen bestimmt werden.

Auf Bierwürzeagar wächst *Fusarium lateritium* Nees mit einem leuchtend roten Myzel, *Pleospora herbarum* (Persoon) Rabenhorst mit einem olivgrünen bis braunen Myzel und *Plenodomus Rabenhorstii* Preuß. mit einem schwarzgrünen bis schwarzen Myzel.

Die übrigen, nur vereinzelt auftretenden Mikroorganismen wurden nicht näher bestimmt. Für die weiteren Versuche wurden nur die Mikroorganismen gewählt, die wirklich immer und reichlich auftraten.

## B. Die Verteilung der Mikroorganismen im Krebse

Das Ergebnis der mikroskopischen Untersuchungen der gefärbten Schnitte kann durch Isolierung der Mikroorganismen aus den verschiedenen Zonen bestätigt werden. Mehrere Krebse wurden unter sterilen Bedingungen in Scheiben und diese wieder in Sektoren zerlegt. Die diesen Sektoren entnommenen möglichst kleinen Holzstücke wurden auf Malzagarplatten ausgelegt.

In Gewebestücken, die unter noch nicht verfärbter Rinde lagen (Abb. 11 und 12 Zone A), lassen sich so weder Bakterien noch Pilze feststellen. Aus dem Holze der Zone B, unter der verfärbten Rinde, wachsen meist nur Bakterien. Das Gewebe der Zonen C und D ist von Bakterien und von Pilzen durchwachsen. In der Zone D überwiegen die Pilze. Wird ein Sektor in die Tiefe differenziert, so ergibt sich: In dem Gewebe an der Grenze des Krankheitsherdens finden sich in einer schmalen Zone nur Bakterien; gegen das Krebszentrum zu steigt die Zahl der Pilzkolonien.

Zusammenfassend kann gesagt werden: An der Grenze zwischen gesundem und krankem Gewebe lassen sich meist nur Bakterien feststellen. Im Krebsgewebe finden sich Bakterien und Pilze.



### C. Die Mikroorganismen aus Krebsen verschiedener Fundorte

Nach den in den vorhergehenden Abschnitten beschriebenen Methoden wurde aus Krebsen aller Fundorte die Mikroflora isoliert und bestimmt. Das überraschende Ergebnis ist in Tabelle 1 zusammengestellt.

Aus allen Krebsen sämtlicher Fundorte lassen sich neben *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* nicht beliebige, zufällige Pilze und Bakterien, sondern immer die drei gleichen Pilze (*Fusarium lateritium*, *Pleospora herbarum* und *Plenodomus Rabenhorstii*) isolieren. Der Anteil der einzelnen Pilze an der Erkrankung schwankt von Fundort zu Fundort. Das eine Mal ist *Fusarium lateritium* am häufigsten (z. B. Hirzegg, Schnebelhorn), das andere Mal überwiegt *Plenodomus Rabenhorstii* (z. B. Regensberg). *Pleospora herbarum* ist meist am schwächsten vertreten. In einem Gebiet mit einer Längenerstreckung von 45 km, von Regensberg bis zum Schnebelhorn und mit einer Höhendifferenz von 880 m, ist somit *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* immer von der gleichen Mikroorganismengesellschaft, Mikroassoziation, begleitet. Dabei sind offenbar *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* als der Primärerreger, die drei Pilze als die Sekundärparasiten anzusehen.

Die Beziehungen zwischen diesen vier Mikroorganismen in *vivo* und in *vitro* sollen in den folgenden Kapiteln untersucht werden.

Tabelle 1

Übersicht der Mikroorganismen der verschiedenen Fundorte

Fundorte:	K	H	Anzahl der Holzproben (in ‰; H = 100 ‰) mit Kolonien von:				
			<i>Pseudomonas savastanoi</i>	<i>Fusarium lateritium</i>	<i>Pleospora herbarum</i>	<i>Plenodomus Rabenhorstii</i>	unbestimmte Pilze
Regensberg	15	300	98	55	26	91	12
Rümlang	10	200	88	48	36	41	7
Bassersdorf	10	200	98	88	70	55	4
Katzenrüti	15	300	92	80	55	57	13
Aegerten	20	400	95	76	69	57	6
Mädikon	10	200	89	75	60	73	12
Entlisberg	10	200	88	71	75	65	9
Buchenegg	10	200	90	66	48	43	5
Steg	10	200	93	98	52	26	8
Hirzegg	10	200	88	93	56	36	4
Schnebelhorn	10	200	93	82	39	29	6

K = Zahl der untersuchten Krebse. H = Zahl der untersuchten Holzproben

Eschenrose und Klunker, die nach den gleichen Methoden untersucht wurden, haben dagegen nur wenige und ganz andere Mikroorganismen.

## 2. KAPITEL

Die Mikroorganismen *in vitro*

## § 1. Methoden

## A. Chemikalien und Nährlösungen

Die Nährlösungen wurden mit Substanzen der Qualität „reinst“ hergestellt.

1. Nährlösung nach Czapek (THOM, 1930):  
 $\text{NaNO}_3$  3,0 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1,0 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0,5 g,  $\text{KCl}$  0,5 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0,01 g, Saccharose 30,0 g,  $\text{H}_2\text{O}$  dest. 1000 ml.
2. Nährlösung nach Fries I (FRIES, 1938):  
 $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1,0 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,0 g,  $\text{KCl}$  0,5 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0,5 g,  $\text{FeCl}_3$  (1<sup>0</sup>/oige Lösung) 10 Tropfen, Glukose 10 g,  $\text{H}_2\text{O}$  dest. 1000 ml.
3. Nährlösung nach Fries II (FRIES, 1938):  
 $\text{NH}_4$ -Tartrat 5,0 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,5 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0,5 g,  $\text{FeCl}_3$  (1<sup>0</sup>/oige Lösung) 10 Tropfen, Glukose 20 g,  $\text{H}_2\text{O}$  dest. 1000 ml.
4. Nährlösung nach Fries III (FRIES, 1938):  
 $\text{NH}_4$ -Tartrat 5,0 g,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1,0 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,0 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0,5 g,  $\text{NaCl}$  0,1 g,  $\text{CaCl}_2$  0,1 g,  $\text{FeCl}_3$  (1<sup>0</sup>/oige Lösung) 10 Tropfen, Glukose 20 g,  $\text{H}_2\text{O}$  dest. 1000 ml.
5. Nährlösung nach Knop mit Glukose (FREY-WYSSLING, 1949; FLÜCK, 1955):  
 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  1,0 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0,25 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,25 g,  $\text{KCl}$  0,125 g,  $\text{FeCl}_3$  Spur, Glukose 20 g,  $\text{H}_2\text{O}$  dest. 1000 ml.
6. Nährlösung nach Raulin (THOM, 1930):  
 $\text{H}_2\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6$  4,0 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6$  4,0 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  0,6 g,  $\text{K}_2\text{CO}_3$  0,6 g,  $\text{MgCO}_3$  0,4 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,25 g,  $\text{ZnSO}_4$  0,07 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0,07 g, K-Silikat 0,07 g, Saccharose 70,0 g,  $\text{H}_2\text{O}$  1500 ml.
7. Nährlösung nach Richard 5 (LUZ, 1934):  
 $\text{NH}_4\text{NO}_3$  10,0 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5,0 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  2,5 g,  $\text{FeCl}_3$  0,02 g, Glukose 50,0 g,  $\text{H}_2\text{O}$  dest. 1000 ml.
8. Nährlösung nach Stapp I (STAPP, 1942):  
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  1,0 g,  $\text{CaCl}_2$  0,5 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1,0 g,  $\text{KNO}_3$  5,0 g, Saccharose 20,0 g,  $\text{H}_2\text{O}$  1000 ml.
9. Nährlösung nach Stapp II (STAPP, 1942):  
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  1,0 g,  $\text{CaCl}_2$  0,5 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1,0 g, Asparagin 5,0 g, Glukose 20,0 g,  $\text{H}_2\text{O}$  1000 ml.
10. Nährlösung nach Weindling (BRIAN und HEMMING, 1945):  
 $(\text{NH}_4)_2\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6$  2,0 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2,0 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  1,0 g,



$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0,01 g, Dextrose 25,0 g,  $\text{H}_2\text{O}$  dest. 1000 ml, pH (mit  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) 3,5,

#### 11. Nährlösung nach Woolley (WOOLLEY, 1952):

$\text{KNO}_3$  5,0 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,8 g,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0,8 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0,2 g,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  0,1 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0,02 g, Saccharose 10,0 g,  $\text{H}_2\text{O}$  1000 ml.

### B. pH - Messung

Die Bestimmung der pH-Werte erfolgte elektrometrisch mit einem Glaselektrodengerät.

### C. Impfmateri al

#### 1. Bakterien

Als Impfmateri al wurde eine sieben Tage alte Nährbouillonkultur von *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini*, die bei 24 ° C im Dunkeln inkubiert worden war, verwendet.

#### 2. Pilze

Durch Zugabe von 100 ml destilliertem sterilem Wasser zu einer Reiskultur wurde eine Konidien suspension hergestellt. Die Reiskultur war während zehn Tagen im Dunkeln bei 18 ° C und anschließend zehn Tage an einem Zimmerfenster inkubiert worden.

### D. Nachweis biologisch aktiver Stoffe

#### 1. Plattenteste

Als Mikroorganismen bei den üblichen Plattentesten (z. B. GROVE und RANDALL, 1955) wurden verwendet:

<i>Bacillus subtilis</i>	. . . . .	Stamm ETH 2016
<i>Escherichia coli</i>	. . . . .	Stamm ETH 2018
<i>Bacillus megatherium</i>	. . . . .	Stamm ETH 2040
<i>Candida vulgaris</i>	. . . . .	Stamm ETH 5897
<i>Micrococcus pyogenes</i> var. <i>aureus</i>	. . . . .	Stamm ETH 5870

Herstellung des Extraktes. Das Kulturfiltrat wird zweimal mit der Hälfte seines Volumens mit Essigester kräftig ausgeschüttelt. Die beiden vereinigten Auszüge werden am Vakuum einer Wasserstrahlpumpe auf dem Wasserbad bei 50 ° C zur Trockene eingedampft und der Rückstand in destilliertem Wasser (1 ml/100 ml Kulturfiltrat) gelöst.

Der zum Extrahieren benötigte Essigester wurde zuerst mit Sodawasser gewaschen und eine Probe als Kontrolle zur Trockene eingedampft und wie angegeben getestet.

In gleicher Art und Weise wurde auch die nicht inkubierte Nährlösung als Kontrolle getestet.

## 2. *Ustilago*-Test

Der von KOBEL (1951) und KERN (1952) beschriebene Sporenkeimungstest mit Brandsporen von *Ustilago zeae* (Beckm.) Ung. eignet sich in vielen Fällen zum Nachweis oder zur Aufarbeitung biologisch aktiver Stoffe in Kulturfiltraten. Die zu prüfende Lösung wird in einer Verdünnungsreihe mit Leitungswasser vermischt, eine Sporensuspension aus Brandsporen und Keimungsnährlösung zu den einzelnen Verdünnungsstufen gebracht und nach 16 bis 18 Stunden der Prozentsatz der gekeimten Sporen bestimmt. Als Einheitsgrenze wird die Konzentration definiert, die die Sporenkeimung um 50 % herabsetzt ( $LD_{50}$ ). Die  $LD_{50}$  werden graphisch oder rechnerisch aus den Keimprozenten der Verdünnungsstufen bestimmt. Die Aktivität wird in *Ustilago*-Einheiten/ml (UE/ml) angegeben.

## 3. Welketest

Zur Charakterisierung und Symptomerkennung biologisch aktiver Stoffe wurden Welkeversuche bei künstlichem Licht, einer Temperatur von  $21 \pm 1^\circ \text{C}$  und einer Luftfeuchtigkeit von 60 bis 70 % mit sechs bis acht Wochen alten Tomatensprossen durchgeführt. Die Sprossen umfassen die obersten vier Blätter und haben ein Gewicht von 1 bis 2 g. Beschreibungen finden sich bei GÄUMANN, NAEF-ROTH und KOBEL (1952); ZÄHNER (1954) und LINSKENS (1955).

### § 2. *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* (Brown) Dowson

*Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* (DOWSON, 1943) ist eine Varietät des Ölbaumkrebserreger, *Pseudomonas savastanoi* (E. F. Smith) Stevenson (E. F. SMITH, 1905 und 1913; C. O. SMITH, 1922 und BROWN, 1932). Eine weitere Varietät von *Pseudomonas savastanoi* ist auch der Erreger des Oleanderkrebses, *Pseudomonas tonelliana* (Ferraries) Burkholder oder *Pseudomonas savastanoi* var. *nerii* C. O. Smith (ELLIOT, 1951).

Synonym zu *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* (Brown) Dowson sind (Dowson, 1943; ELLIOT, 1951):

*Bacterium savastanoi* var. *fraxini* Brown

*Phytomonas savastanoi* var. *fraxini* (Brown) Magrou

*Agrobacterium savastanoi* var. *fraxini* (Brown) Starr und Weiss

*Pseudomonas fraxini* (Brown) Skoric.

Die Bakterien lassen sich mit Methylenblau („Ciba“) färben. Sie erscheinen als blaue Stäbchen, deren Größe 0,4 bis 0,8  $\mu$  in der Breite und 1,4 bis 3,4  $\mu$  in der Länge beträgt. Die Bakterien bewegen sich mit Hilfe von Geißeln, die durch eine Beizung mit Casares-Gillösung („Ciba“) und nachfolgender Färbung mit Karbol-Fuchsin Ziehl-Neelsen („Ciba“) gut nachgewiesen werden können (CIBA, 1940). Die einzelnen Geißeln lassen sich nicht deutlich unterscheiden, doch kann ihr gemeinsamer Ansatzpunkt, der Pol, an einem Ende des Stäbchens erkannt werden. In Kulturen treten die Bakterien einzeln auf, selten in Paaren oder gar in kurzen Ketten. Die Gelatine wird nicht verflüssigt. Auf Malzagar scheiden die Bakterien geringe



Mengen eines grün fluoreszierenden, im UV-Licht gut sichtbaren Pigments ins Nährsubstrat aus.

*Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* ist in Österreich, Jugoslawien, Deutschland, Italien, England (ELLIOT, 1951), Holland (VAN VLIET, 1931) und der Schweiz nachgewiesen. Als Wirtspflanzen sind bekannt:

die europäische Esche, *Fraxinus excelsior*,

die amerikanische Esche, *Fraxinus americana*.

Infektionsversuche auf dem Ölbaum, *Olea europaea*, blieben ohne Erfolg (ELLIOT, 1951; OLIVEIRA, 1940; BROWN, 1932).

### A. Wachstum und Toxinbildung in vitro

Für die Kulturversuche in vitro und die Infektionsversuche wurde ein aus einem Krebs der Fundstelle Bassersdorf isolierter Stamm von *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* (Stamm ETH M 142) verwendet.

#### 1. Die Temperatur als Wachstumsfaktor

Die optimale Wachstumstemperatur liegt nach ELLIOT (1951) bei 23 bis 24 °C, die höchst ertragbare bei 32 °C und die Minimaltemperatur bei 5 °C.

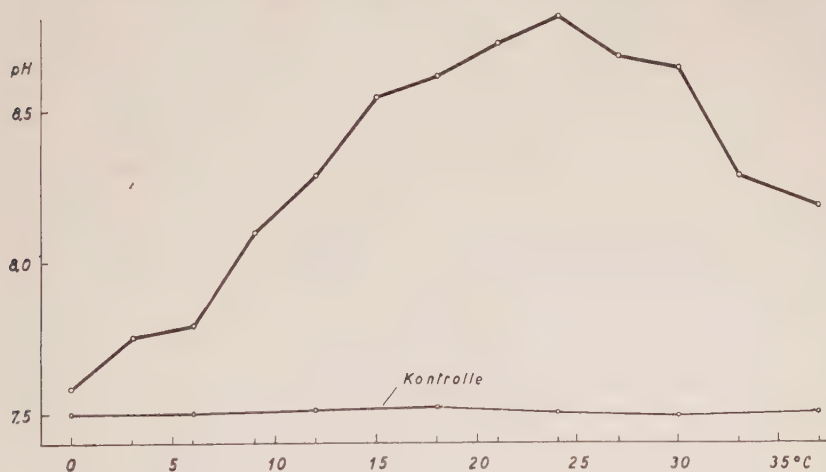


Abb. 14. *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini*. pH-Werte in Nährbouillon-Kulturen bei verschiedenen Temperaturen nach vier Wochen

Die Kurve in Abb. 14 wurde durch die Messung der mit der Lebenstätigkeit der Bakterien zusammenhängenden Veränderungen der pH-Werte der Kulturlösung erhalten.

Die auf diese Weise ermittelte optimale Wachstumstemperatur liegt ebenfalls bei 23 bis 24 °C; bei 0 °, 33 ° und 37 °C ist das Wachstum dagegen nicht völlig unterbunden. Die Trübung der Nährlösung ist, besonders bei der Stufe 0 °C, außerordentlich schwach. Der Unterschied gegenüber den Angaben von ELLIOT (1951) dürfte als Besonderheit des verwendeten Stammes erklärt werden.

## 2. Wachstum und Toxinbildung auf verschiedenen Nährlösungen

*Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* wurde auf den Nährlösungen (ohne Stapp II) der S. 14 kultiviert. Diese „Mineral“-Nährlösungen enthalten außer Zucker — Glukose oder Saccharose — und Weinsäure — als Säure oder Anion — keine weiteren organischen C- und, außer dem in  $\text{NO}_3^-$  oder  $\text{NH}_4^+$  gebundenen Stickstoff, keine weiteren N-Quellen.

Die Kulturen wurden während sechs Wochen bei  $24^\circ \text{C}$  gehalten. *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* wächst auf allen diesen Nährlösungen, mit Ausnahme der Nährlösung Stapp I, schlecht. Der pH-Wert wird überall, im Gegensatz zu den Nährbouillonkulturen, um wenig *herabgesetzt*. Im Kulturfiltrat aller Nährlösungen lassen sich keine *Ustilago*-aktiven Stoffe nachweisen; im Essigesterextrakt wird nur bei der Nährlösung Stapp I eine *subtilis*-Aktivität gefunden.

Tabelle 2

Wachstum, *subtilis*- und *Ustilago*-Aktivität von *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* auf verschiedenen „Mineral“-Nährlösungen nach sechs Wochen bei  $24^\circ \text{C}$

Nährlösung	pH		Wachstum	<i>Subtilis</i> - Aktivität des Kulturfiltrat- Extraktes Hemmhof $\varnothing$ in mm	<i>Ustilago</i> - Aktivität UE/ml Kulturfiltrat
	Anfang	Ende			
Czapek .....	3,5	3,7	spärlich	0 mm	0 UE/ml
Fries I .....	4,6	4,0	spärlich	0 mm	0 UE/ml
Fries I + KOH .....	6,0	3,8	spärlich	0 mm	0 UE/ml
Fries II .....	6,1	5,7	spärlich	0 mm	0 UE/ml
Fries III .....	4,6	4,0	spärlich	0 mm	0 UE/ml
Fries III + KOH .....	6,0	5,4	spärlich	0 mm	0 UE/ml
Knop mit Glukose ...	5,6	4,8	spärlich	0 mm	0 UE/ml
Raulin .....	5,6	4,0	spärlich	0 mm	0 UE/ml
Richard 5 .....	5,6	4,8	spärlich	0 mm	0 UE/ml
Stapp I .....	7,0	4,6	gut	17 mm	0 UE/ml
Weindling .....	5,6	3,5	spärlich	0 mm	0 UE/ml
Woolley .....	5,6	4,7	spärlich	0 mm	0 UE/ml

Unter gleichen Bedingungen wurde *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* auf einigen für Bakterien geeigneten Nährlösungen mit besonderen organischen Zusätzen gezüchtet. Diese in Tabelle 3 zusammengestellten Nährlösungen enthalten, neben genau definierten organischen Zusätzen, wie Asparagin, auch andere, in ihrer Zusammensetzung unbekannte, wie Pepton oder Fleischextrakt (Oxoid Lab Lemco).

In dieser Nährlösungsreihe ist das Wachstum von *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* bedeutend besser als in der vorhergehenden. Die pH-Werte steigen in zwei Fällen, in den übrigen wird durch das Bakterium die Azidität erhöht. Das Kulturfiltrat zeigt keine *Ustilago*-Aktivität, doch der Extrakt des Kulturfiltrates enthält ein *subtilis*-aktives Agens.



Tabelle 3

Wachstum, *subtilis*- und *Ustilago*-Aktivität von *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* auf verschiedenen Nährlösungen, die organische Zusätze enthalten. Kultur sechs Wochen bei 24° C

Nährlösung	N-Quellen	pH		Wachstum Oberflächen- haut vorhanden: + fehlt: —	Subtilis- Aktivität des Kulturfiltrat- Extraktes Hemmhof $\phi$ in mm	Ustilago- Aktivität UE/ml Kulturfiltrat
		Anfang	Ende			
Dame (DAME, 1938)	5 g Pepton 5 g Harnstoff	5,6	4,6	gut —	20 mm	0 UE/ml
Stalder (STALDER, 1951)	10 g Difco Yeast Extrakt	6,2	8,8	gut +	Spur	0 UE/ml
Stapp II (STAPP, 1942)	5 g Asparagin	7,0	3,4	gut —	22 mm	0 UE/ml
Mushin (KUNZ, 1952)	3 g Pepton	6,8	5,6	gut —	Spur	0 UE/ml
Nährbouillon (MEYER, 1903)	10 g Pepton 10 g Fleisch- extrakt	7,2	8,4	gut +	12 mm	0 UE/ml
Wotherspoon (WOTHERSPOON, 1931)	1 g Asparagin	6,7	3,5	gut —	Spur	0 UE/ml

Tabelle 4

Wachstum und Toxinbildung von *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* auf modifizierten Nährlösungen nach Stapp II, nach acht Wochen bei 24° C

Nährlösung	pH		Wachstum	Subtilis-Aktivität des Kulturfiltrat- Extraktes Hemmhof $\phi$ in mm	Ustilago- Aktivität UE/ml Kulturfiltrat
	Anfang	Ende			
Stapp II + 5 g/l $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ..	6,5	5,8	schlecht	18 mm	0 UE/ml
Stapp II + 5 g/l $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ..	6,5	5,6	schlecht	14 mm	0 UE/ml
Stapp II (5 g/l Asparagin) ...	6,5	3,3	mittel	20 mm	0 UE/ml
Stapp II + 5 g Harnstoff ...	6,5	4,2	mittel	17 mm	0 UE/ml
Stapp II + 5 g/l Glykokoll .	6,5	3,5	gut	17 mm	0 UE/ml
Stapp II + 5 g/l Glutamins. .	6,5	4,9	gut	13 mm	0 UE/ml
Stapp II + 2 g/l Asparagin .					
+ 0,1 g/l Trypto. .	6,5	3,3	gut	23 mm	0 UE/ml
Stapp II + 5 g/l Pepton ....	6,5	3,3	gut	20 mm	0 UE/ml
Stapp II + 2 g/l Asparagin .					
+ 5 g/l Glutamins. .	6,5	3,4	gut	22 mm	0 UE/ml

*Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* bildet vor allem dann ein biologisch aktives Stoffwechselprodukt, wenn organisch gebundener Stickstoff vorhanden ist.

Die Nährlösung nach Stapp II wurde daher durch Zugabe verschiedener Stickstoffquellen modifiziert (Harnstoff,  $\text{NH}_2\text{CONH}_2$ ; Asparagin,  $\text{NH}_2\text{COCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$ ; d,l-Tryptophan,  $\text{C}_8\text{H}_6\text{NCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$ ; Glykokoll,  $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$  und d,l-Glutaminsäure,  $\text{COOH}(\text{CH}_2)_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$ ).

Die Kulturen wurden während acht Wochen bei  $24^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

Das Wachstum ist auf den Nährlösungen mit organisch gebundenem Stickstoff besser als auf denen, die ihn in Form von  $\text{NH}_4^+$  oder  $\text{NO}_3^-$  enthalten. Das zeigt sich sowohl visuell in der unterschiedlichen Trübung, als auch in der verschiedenen starken Veränderung der pH-Werte. Die organischen Stickstoffquellen stellen gleichzeitig noch zusätzliche Kohlenstoffquellen dar. Eine Kombination mehrerer C- und N-Quellen kann wahrscheinlich besser ausgenützt werden als jede Komponente für sich (STEINBERG, 1934; GAMP, 1923; WOLF und WOLF, 1947).

Auf die Toxinbildung haben die einzelnen Zusätze verschiedene Wirkung. Am besten eignet sich eine Mischung von 2 g/l Asparagin + 0,1 g/l Tryptophan.

Zugabe von  $\text{TiSO}_4$ : Da STAPP (1942) durch Zugabe von  $\text{TiSO}_4$  die Virulenz von *Pseudomonas tumefaciens* stark steigern konnte, wurde versucht, mit  $\text{TiSO}_4$  auch die Toxinbildung von *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* zu beeinflussen.

Stapp II ohne  $\text{TiSO}_4$  Hemmung 20 mm  $\phi$ ,

Stapp II mit 0,0001 %  $\text{TiSO}_4$  Hemmung 21 bis 22 mm  $\phi$ .

$\text{TiSO}_4$  übt auf die Toxinbildung einen günstigen Einfluß aus.

### 3. Die Abhängigkeit der Toxinbildung von der Zeit

*Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* wurde während acht Wochen bei  $24^\circ\text{C}$  auf der Nährlösung Stapp II inkubiert. Alle zwei Wochen wurden der pH-Wert und die *subtilis*-Aktivität bestimmt (Tabelle 5).

Tabelle 5

*Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini*. Abhängigkeit der Toxinbildung von der Zeit. Nährlösung Stapp II bei  $24^\circ\text{C}$

Zeit	pH	<i>Subtilis</i> -Aktivität des Kulturfiltrat- Extraktes Hemmhof $\phi$ in mm	Sedimentbildung
0 Wochen	6,5	0 mm	—
2 Wochen	5,5	0 mm	—
4 Wochen	4,2	10 mm	spärlich
6 Wochen	4,3	14 mm	mäßig
8 Wochen	4,2	20 mm	stark



Nach vier Wochen erreicht der pH-Wert seinen tiefsten Stand. Die merkliche Toxinbildung setzt in diesem Zeitpunkt ein und steigt langsam an. Da zugleich Sediment abgelagert wird, dürfte zwischen Toxinbildung und Autolyse der Bakterien ein Zusammenhang bestehen.

#### 4. Toxinproduktion bei verschiedenen Stämmen

Fünf Stämme von *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* von verschiedenen Eschenkrebs-Standorten (Stamm ETH M 141 Regensburg, Stamm ETH M 142 Bassersdorf, Stamm ETH M 143 Schnebelhorn, Stamm ETH M 144 Mädikon und Stamm ETH M 145 Aegerten) wurden während acht Wochen bei 24 ° C auf Stapp II kultiviert und ihre Toxinproduktion verglichen.

Die Toxinproduktion ist nicht bei allen Stämmen gleich groß. Am aktivsten erwiesen sich Stamm ETH M 141 Regensburg und Stamm ETH M 142 Bassersdorf. Wie weit die Fähigkeit der einzelnen Stämme, Toxin zu bilden, durch die Kulturdauer auf künstlichen Nährböden beeinflusst wird, muß noch untersucht werden.

#### B. Aufarbeitung der toxinhaltigen Kulturfiltrate

Mit Hilfe des *subtilis*-Plattentestes können die toxinhaltigen Kulturlösungen aufgearbeitet werden.

Das aktive Agens läßt sich durch verschiedene organische Lösungsmittel (Äther, Essigester [Athylacetat], Chloroform und Benzol, nicht aber mit Petroläther) aus der Kulturlösung extrahieren. Am besten eignet sich Essigester, da keine störenden Emulsionen entstehen.

Die Kulturlösung (die Bakterien brauchen nicht abgetrennt zu werden) wird dreimal mit Essigester (einmal mit der Hälfte und zweimal mit je ein Viertel des zu extrahierenden Volumens) kräftig während längerer Zeit im Scheidetrichter ausgeschüttelt. Die vereinigten Essigesterazüge werden auf dem Wasserbad bei 50 ° C am Vakuum zur Trockene eingedampft. Der Rückstand, der Rohextrakt, ist braun und zähflüssig.

Zur weiteren Reinigung wird der Rohextrakt in einen sauren, neutralen und basischen Anteil getrennt. Die gesamte Aktivität bleibt im farblosen Neutralteil. Die aktive Substanz ist ein Neutralstoff. Ob sie aus einer oder mehreren Komponenten besteht, kann nur eine weitere Untersuchung mit Hilfe der Säulen- und Papierchromatographie zeigen.

#### C. Wirkungen des Toxins

Das Agens hemmt nicht nur *Bacillus subtilis*, sondern auch *Escherichia coli*, *Bacillus megatherium*, *Candida vulgaris* und *Micrococcus pyogenes* var. *aureus*, jedoch in verschiedenem Ausmaße. An Tomatensprossen erzeugt der Rohextrakt Welkeschäden. Der Stengel und die Blattstiele kollabieren, doch bleiben die Fiederblättchen voll turgeszent. Bei ihnen bilden sich die ersten Nekrosen längs der Mittelrippe.

Der hier beschriebene Welkestoff von *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* ist ziemlich sicher verschieden von den Glukosanen des *Pseudomonas tumefaciens* (HODGSON et al., 1947), welche an Tomatenpflanzen grundsätzlich andere Welkesymptome auslösen.

Ob die aktive Substanz von *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* in der krebsskranken Esche gebildet wird, bleibt noch zu untersuchen.



Abb. 15. Welkesymptome am Stengel eines Tomatensprosses, ausgelöst mit dem Rohextrakt des Kulturfiltrates von *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* auf Nährlösung Stapp II.  
Leicht vergrößert

Abb. 16 (links): Symptome auf Tomatenblättern, ausgelöst mit dem Rohextrakt des Kulturfiltrates von *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* auf Nährlösung Stapp II.  $\frac{2}{3}$  nat. Größe

Abb. 17 (rechts). Symptome auf Tomatenblättern, ausgelöst mit dem Rohextrakt des Kulturfiltrates von *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* auf Nährlösung Stapp II.  $\frac{2}{3}$  nat. Größe

Abb. 15



Abb. 16



Abb. 17

### § 3. *Fusarium lateritium* Nees

#### A. Allgemeines

*Fusarium lateritium* ist als Erreger von Knospenschäden, Fruchtfäule und Spitzendürre von Fruchtbäumen aller Art weit verbreitet. Ebenso tritt es an frostgeschädigten Pflanzen, unterirdischen Pflanzenteilen und vielfach zusammen mit Rindenfäule und *Nectria*-Krebs an verschiedenen Bäumen auf. *Fusarium lateritium* kommt in allen Weltteilen vor, besonders in der gemäßigten Zone.

Die Hauptfruchtform, *Gibberella baccata* (Wallr.) Sacc., ist auf vielen Bäumen nachgewiesen, so auch auf *Fraxinus excelsior* (WOLLENWEBER und REINKING, 1935; SACCARDO, 1898).

*Fusarium lateritium* (Stamm ETH M 146 Bassersdorf und Stamm ETH M 147 Aegerten) wächst auf Malzagar und im Malzwasser (mit Glaswolle als Myzelstütze) mit einem kirsch- bis purpurrotem Myzel. Das Luftmyzel ist weiß bis gelblich getönt. Auf geeigneten und dem Licht ausgesetzten Nährböden werden in ziemlich kompakten Schleimen, den Pionnotes, Konidien gebildet. Diese Nährböden wurden schon früher (Seite 11) näher beschrieben. Vorherrschend sind 5-septierte Konidien von der Größe  $45 \text{ bis } 55 \mu \times 3,2 \text{ bis } 4,5 \mu$ . Der Durchschnitt auf 100 Messungen ergibt  $50 \mu \times 4,2 \mu$ . Neben diesen Quinqueseptaten kommen aber noch 3- bis 7-septierte vor. Die Konidien sind sichelförmig, ihre gerundeten Enden verjüngen sich.

#### B. Wachstum und Toxinbildung *in vitro*

Für diese Versuche wurde *Fusarium lateritium* Stamm ETH M 146 Bassersdorf verwendet.

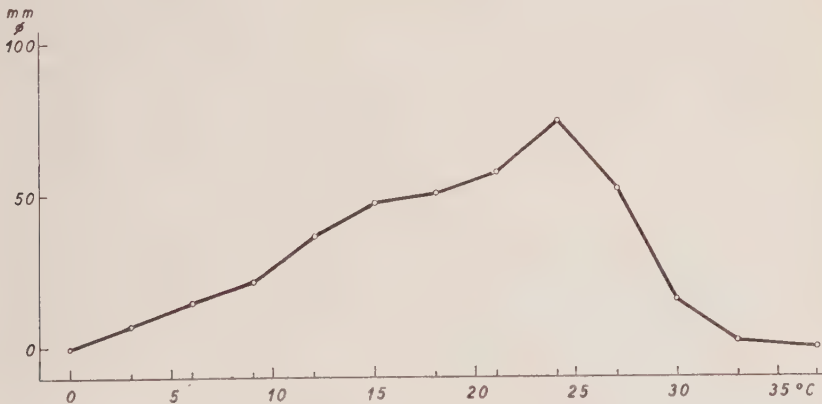


Abb. 18. Wachstum von *Fusarium lateritium* auf Malzagar. Mittlerer Durchmesser der Plattenkulturen bei verschiedenen Temperaturen nach zehn Tagen.  
Ordinate: Durchmesser in mm, Abszisse: Temperatur in °C

Der Zusammenhang zwischen Wachstum und Temperatur wurde bestimmt durch Messung des mittleren Durchmessers von je zehn Kolonien von



*Fusarium lateritium*, die bei verschiedenen Temperaturen von 0° bis 37° C, in Intervallen von 3° C, gewachsen waren (Abb. 18).

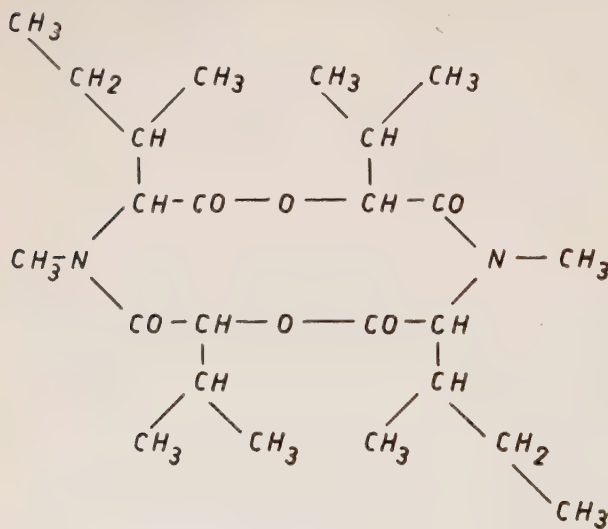
Das Wachstumsoptimum liegt, übereinstimmend mit den Angaben der Literatur (OUDEMANS, 1923), bei 23° bis 24° C. Auffallend ist das mit steigender Temperatur gleichmäßig zunehmende Wachstum sowie der starke Abfall bei Temperaturen über 24° C.

Die Gruppe der Fusarien ist schon mehrfach auf toxische Stoffwechselprodukte untersucht worden. Von verschiedenen Fusarien sind mehrere Antibiotika bekannt geworden (GÄUMANN et al., 1947; COOK et al., 1947; PLATTNER et al., 1948; GÄUMANN et al., 1950).

Isoliert wurden aus *Fusarium lateritium* Enniatin A, mit dem Lateritiin I identisch ist, und die verwandten Stoffe Lateritiin II und Fructigenin.

Das Filtrat von Richard-5-Kulturen zeigte keine *Ustilago*-, sein Extrakt nur eine schwache *subtilis*-Aktivität.

Entsprechend der Vorschrift von NAGER (1948) wurde in zwei Versuchen das Myzel von 200 Erlenmeyerkulturen auf Enniatin aufgearbeitet.



Die erhaltenen kristallinen Fraktionen zeigen die gleichen Eigenschaften wie die beschriebenen Enniatine. Sie wurden chemisch nicht mehr weiter untersucht. Die Konstitution der Enniatine wurde durch PLATTNER und NAGER (1948 a und 1948 b) aufgeklärt. Enniatin A,  $C_{24}H_{42}O_6N_2$  ist eine zyklische Verbindung mit zwölf Ringgliedern.

Formel von Enniatin A

#### § 4. *Pleospora herbarum* (Persoon) Rabenhorst

*Pleospora herbarum* wurde aus dem Eschenkrebs immer in der Nebenfruchtform *Stemphylium botryosum* Wallr. isoliert.

Der Pilz ist ein Ubiquist und tritt als Parasit und als Saprophyt in allen Klimaten der Erde auf (SACCARDI, 1898; RABENHORST, 1903; OUDEMANS, 1923; SIU, 1951).

Monographisch bearbeitete NEERGARD (1945) die Gattung *Stemphylium*, MÜLLER (1951) die schweizerischen Arten der Gattung *Pleospora*.

Die Abhängigkeit des Wachstums von der Temperatur wurde durch Bestimmung des mittleren Durchmessers von je zehn Kolonien auf Malzagarplatten nach zehn Tagen ermittelt. Das Ergebnis ist in Abb. 19 dargestellt.

Der Verlauf dieser Temperaturkurve ist ähnlich den von NEERGARD (1945) mit anderen *Pleospora*- (*Stemphylium*-) Stämmen erhaltenen.

Die optimale Wachstumstemperatur liegt zwischen  $21^{\circ}$  und  $24^{\circ}$  C. Bei  $0^{\circ}$  und  $37^{\circ}$  C stellt *Pleospora herbarum* das Wachstum ein, ohne aber geschädigt zu werden. Die minimale Temperatur liegt ungefähr bei  $3^{\circ}$  C, die maximale bei  $33^{\circ}$  C. Auffallend ist der starke Wachstumsunterschied zwischen  $24^{\circ}$  und  $27^{\circ}$  C.

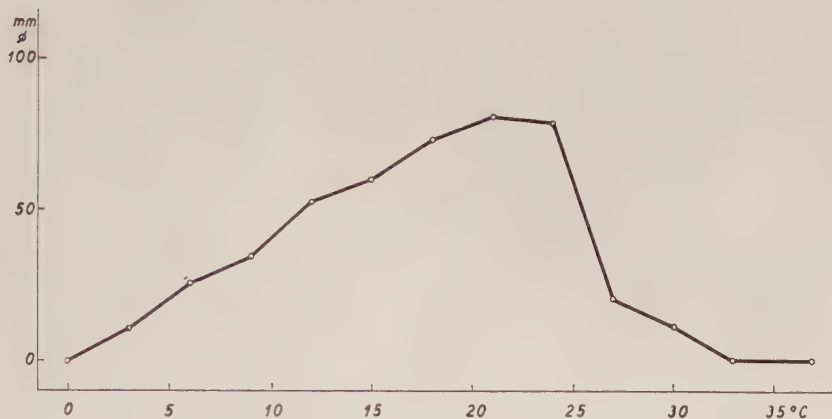


Abb. 19. Wachstum von *Pleospora herbarum* auf Malzagar. Mittlerer Durchmesser der Plattenkulturen bei verschiedenen Temperaturen nach zehn Tagen. Ordinate: Durchmesser in mm, Abszisse: Temperatur in  $^{\circ}$  C

An morphologischen Unterschieden zeigen sich bei den verschiedenen Temperaturen vor allem Veränderungen von Farbe und Luftmyzel:

- |  |  |
|--|--|
| $3^{\circ}$ und $6^{\circ}$ C: Myzel weiß              | Luftmyzel kurz, schwarz  |
| $9^{\circ}$ bis $18^{\circ}$ C: Myzel orange           | Luftmyzel sich stärker und langhaariger entwickelnd, zunehmend stärker gefärbt |
| $21^{\circ}$ und $24^{\circ}$ C: Myzel braun, olivgrün | Luftmyzel hanghaarig, braun, olivgrün  |
| $27^{\circ}$ bis $33^{\circ}$ C: Myzel schwarzbraun    | Luftmyzel kurzhaarig, spärlich   |

Die orangefarbenen Kulturen (bei Temperaturen von  $9^{\circ}$  bis  $18^{\circ}$  C) wechseln innerhalb kurzer Zeit ihre Farbe in braun, wenn sie höheren Temperaturen (über  $24^{\circ}$  C) ausgesetzt werden. Der Vorgang erfolgt auch umgekehrt.

*Pleospora herbarum* bildet auf verschiedenen Kulturlösungen ein biologisch aktives Stoffwechselprodukt. Dieses Toxin konnte mit Hilfe des *subtilis*-Tests aufgearbeitet und isoliert werden. Die näheren Bedingungen der Toxinbildung werden in einer in Vorbereitung befindlichen Arbeit (RIGGENBACH, 1956) beschrieben. Das Toxin wird dort Pleosporin genannt.

Pleosporin ist ein Welketoxin, das vor allem auf die Blätter, nicht aber auf den Stengel, von Tomatensprossen wirkt. Die am Blattrand liegenden Interkostalfelder werden zuerst geschädigt; später bilden sich, verteilt über das ganze Blatt, nekrotische Stellen. Die Nerven, vor allem die feinen, verfärben sich braunschwarz (Abb. 20 und 21).



Abb. 20 (links). Welkesymptome auf Tomatenblättern, hervorgerufen durch Pleosporin.  
 $\frac{2}{3}$  nat. Größe

Abb. 21 (rechts). Welkesymptome auf Tomatenblättern, hervorgerufen durch Pleosporin.  
 $\frac{2}{3}$  nat. Größe

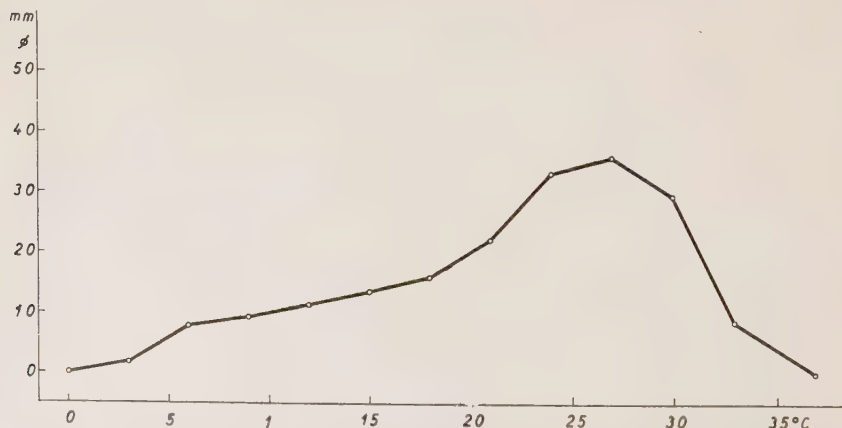


Abb. 22. Wachstum von *Plenodomus Rabenhorstii* auf Malzagar. Mittlerer Durchmesser der Plattenkulturen bei verschiedenen Temperaturen nach 25 Tagen.  
Ordinate: Durchmesser in mm, Abszisse: Temperatur in °C



### § 5. *Plenodomus Rabenhorstii* Preuß.

Die Abhängigkeit des Wachstums von der Temperatur wurde nach der üblichen Methode abgeklärt. Da dieser Pilz viel langsamer als *Fusarium lateritium* und *Pleospora herbarum* wächst, konnten die Durchmesser der Kulturen nicht nach zehn, sondern erst nach 25 Tagen gemessen werden. Die optimale Temperatur liegt höher als bei den anderen Organismen (Abb. 22).

Auch auf flüssigen Nährlösungen ist das Wachstum schlecht; am besten eignet sich noch Richard 5.

*Ustilago*-aktive Stoffwechselprodukte waren in keinem Kulturfiltrat feststellbar, dagegen zeigte der Extrakt von Richard-5-Kulturen geringe Mengen eines *subtilis*-aktiven Stoffes.

### § 6. Die vier Mikroorganismen in Mischkultur

Näher beschrieben werden in diesem Abschnitt einige in das Gebiet von Antagonismus und Synergismus fallende Beziehungen zwischen den vier Mikroorganismen:

*Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* (Brown) Dowson

Stamm ETH M 141 Bassersdorf

*Fusarium lateritium* Nees

Stamm ETH M 146 Bassersdorf

*Pleospora herbarum* (Persoon) Rabenhorst

Stamm ETH M 149 Bassersdorf

*Plenodomus Rabenhorstii* Preuß.

Stamm ETH M 150 Bassersdorf

Angaben über Synergismen von Mikroorganismen finden sich z. B. bei BUCHANAN und FULMER (1930); GWYNE-VAUGHAN und BARNES (1937); JORDAN und BURROWS (1946); WOLF und WOLF (1947); SCHOPFER (1949); GÄUMANN (1951).

Die vier Mikroorganismen können auf 15 verschiedene Arten miteinander kombiniert werden. Dabei sind die Reinkulturen (die Kulturen der vier Mikroorganismen für sich allein), die als Kontrollen dienen, eingeschlossen.

Als Nährlösungen wurden Fries I und Richard 5 gewählt, weil *Pleospora herbarum* auf Fries I ein toxisches Stoffwechselprodukt bildet und Richard 5 für *Fusarium lateritium* und *Plenodomus Rabenhorstii* besonders günstig ist. Mit diesen Nährsubstraten sind die drei Pilze gegenüber *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* bevorzugt.

Die Mischkulturen wurden durch gleichzeitiges Impfen der Nährlösungen mit je 1 ml Sporen- oder Bakteriensuspension der gewählten Mikroorganismen erhalten.

Die Inkubation erfolgte in einem auf 20 ° C regulierten Kulturraum.

# A. Mischkulturen zwischen *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* und einem Pilz

## 1. Mischkultur mit *Pleospora herbarum*

In einem ersten Versuch wurde das Wachstum der Reinkultur mit dem der Mischkultur verglichen. Bestimmt wurden die pH-Werte und die Myzel- oder Bakterientrockengewichte. Als Nährlösung wurde Fries I mit 1 % Glukose verwendet (Abb. 23 und 24).

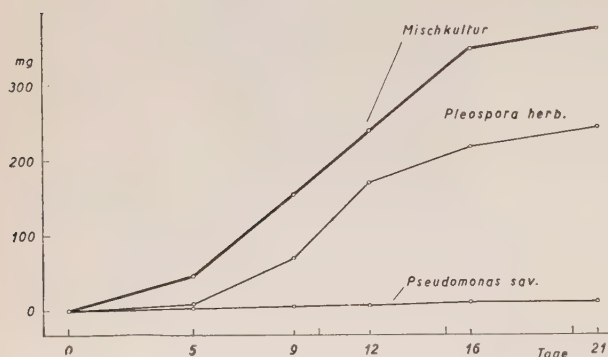


Abb. 23. Zeitliche Zunahme der Myzelgewichte von *Pleospora herbarum* in Rein- und Mischkultur mit *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* auf Nährlösung Fries I mit 1 % Glukose bei 20 ° C.

Ordinate: Trockengewicht in mg, Abszisse: Kulturdauer in Tagen

Schon nach 24 Stunden zeigte die Mischkultur ein verstärktes Myzelwachstum. Sie hob sich durch eine starke Trübung deutlich von der Reinkultur ab. Dieses außerordentliche Wachstum blieb über die ganze Versuchszeit. Die Bakterien wachsen in der Reinkultur schlecht, besser dagegen in der Mischkultur. Hier stehen ihnen wohl besondere organische Verbindungen aus dem Stoffwechsel der Pilze zur Verfügung. Die pH-Werte der Rein- und auch der Mischkultur zeigten den gleichen Verlauf, die Unterschiede zwischen der *Pleospora*-Rein- und der Mischkultur sind klein.

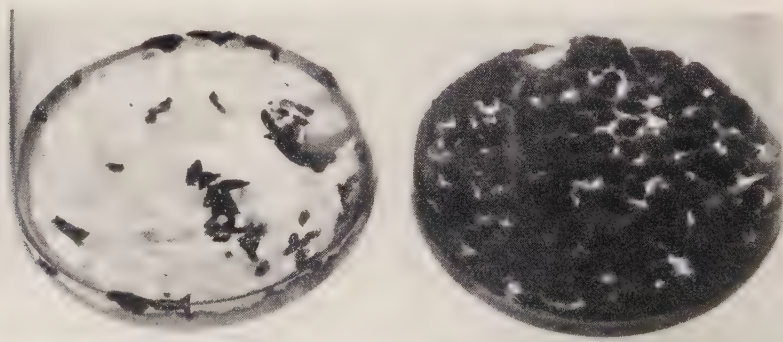


Abb. 24. Links Reinkultur von *Pleospora herbarum*, rechts die Mischkultur mit *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* nach 21 Tagen, auf Fries I mit 1 % Glukose bei 20 ° C.  $\frac{1}{2}$  nat. Größe

Abb. 25. Zeitliche Zunahme der Myzelgewichte von *Pleospora herbarum* in Rein- und in Mischkultur mit *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* auf Nährlösung Fries I ohne Glukose mit 1 % Pektin (60 % verestert) bei 20° C.  
Ordinate: Trockengewicht in mg,  
Abszisse: Kulturdauer in Tagen

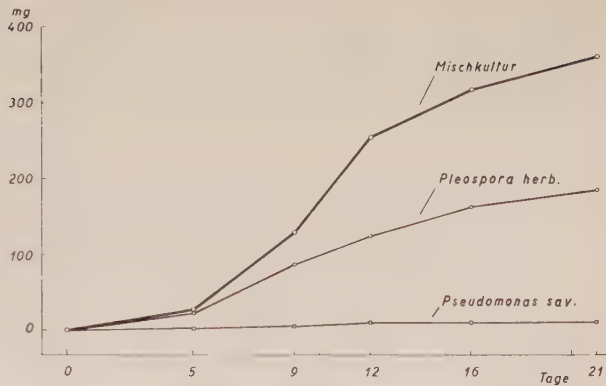


Tabelle 6

pH-Wert und *subtilis*-Aktivität von Rein- und Mischkulturen nach 21 Tagen auf Fries I mit 1 % Glukose

Organismus	pH		Subtilis-Aktivität des Kulturfiltrat- Extraktes Hemmhof $\phi$ in mm
	Anfang	Ende	
<i>Pseudomonas savastanoi</i> var. <i>fraxini</i> ..	4,6	4,0	0 mm
<i>Pleospora herbarum</i> .....	4,6	2,2	20 mm
Mischkultur .....	4,6	2,4	0 mm

Trotz praktisch gleichem pH-Wert und größerem Myzelertrag und obgleich beide Organismen für die Bildung eines *subtilis*-aktiven Stoffes befähigt wären, ist kein toxisches Stoffwechselprodukt mehr nachweisbar.

Da in der Esche neben Glukose auch noch andere Stoffe wie Pektin und Zellulose vorhanden sind, wurde in der Nährlösung die Glukose durch 1 % Pektin (60 % mit Methylalkohol veresterte Polygalakturonsäure) und

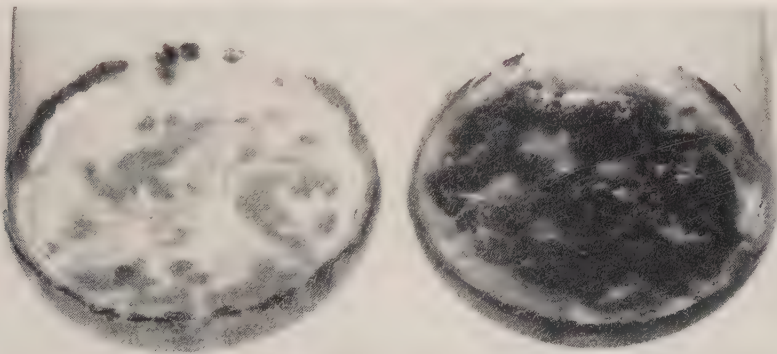


Abb. 26. Links Reinkultur von *Pleospora herbarum*, rechts die Mischkultur mit *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* nach 21 Tagen, auf Fries I ohne Glukose mit 1 % Pektin bei 20° C.  $\frac{1}{2}$  nat. Größe



durch 1 % Methylzellulose ersetzt. Bestimmt wurden wieder die Myzelgewichte, die pH-Werte und die *subtilis*-Aktivitäten der Kulturfiltrat-Extrakte (Abb. 25 bis 28).

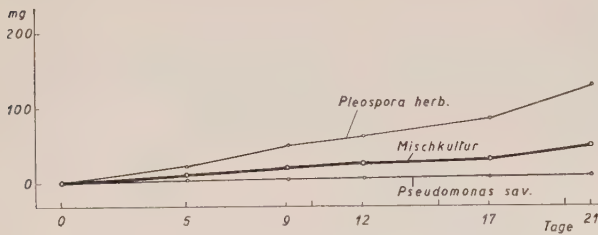


Abb. 27. Zeitliche Zunahme der Myzelgewichte von *Pleospora herbarum* in Rein- und Mischkultur mit *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* auf Nährlösung Fries I ohne Glukose mit 1 % Methylzellulose bei 20 ° C.

Ordinate: Trockengewicht in mg, Abszisse: Kulturdauer in Tagen

Wird die Glukose durch Pektin ersetzt, so bleibt der Verlauf der Myzelgewichte und der pH-Werte ungefähr gleich. Die Mischkultur weist kein *subtilis*-aktives Stoffwechselprodukt auf. Wird die Glukose dagegen durch Methylzellulose ersetzt, so ändert sich der Versuchsablauf. *Pleospora herbarum* hat Mühe, die Methylzellulose als Kohlenstoffquelle auszunützen. Das Wachstum der Mischkultur bleibt zurück, das Myzel bildet kleine, von Bakterien umgebene Körnchen. *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini*, das in der Reinkultur sehr schlecht wächst, schädigt oder zerstört das Myzel.

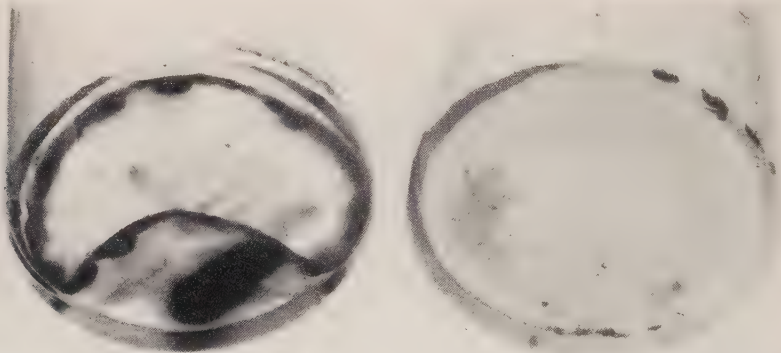


Abb. 28. Links Reinkultur von *Pleospora herbarum*, rechts die Mischkultur mit *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* nach 21 Tagen, auf Fries I ohne Glukose mit 1 % Methylzellulose bei 20 ° C. ½ nat. Größe

Wird die Methylzellulose nicht allein, sondern zusammen mit Glukose gegeben, so verändert sich das Wachstum. Die Nährlösung Fries I enthält nun:

- a) 1 % Glukose
- b) 0,5 % Glukose + 0,5 % Methylzellulose.

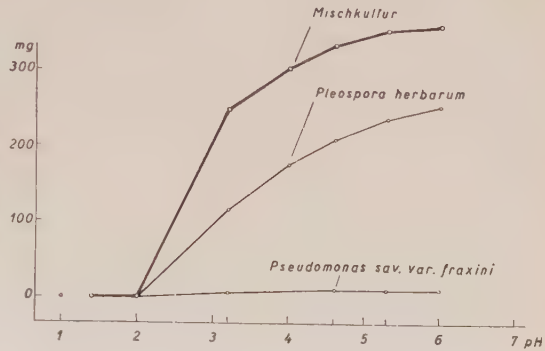
Das Myzelgewicht der Mischkultur übertrifft nun auch das der Reinkultur, ist aber immer noch kleiner als in Nährlösungen mit Glukose oder Pektin als alleinigen C-Quellen.

Daß diese Wachstumsunterschiede zwischen der Rein- und der Mischkultur nicht vom Anfangs-pH der Nährlösung abhängig sind, zeigt Abb. 29.

Fries I (1 % Glukose) wurde mit KOH oder HCl auf pH-Werte zwischen 1 und 7 eingestellt. Höhere pH-Werte konnten nicht in den Versuch einbezogen werden, da die Glukose beim Sterilisieren karamelisiert und das pH auf 7 zurücksinkt.

Abb. 29. Abhängigkeit des Wachstums vom Anfangs-pH der Nährlösung Fries I (1 % Glukose). Myzelgewicht von *Pleospora herbarum* in Rein- und in Mischkultur mit *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* nach 21 Tagen.

Ordinate: Trockengewichte in mg,  
Abszisse: pH-Werte



Durch die Mischkultur mit *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* wird somit in bestimmten Medien das Wachstum von *Pleospora herbarum* stark gesteigert. In den Mischkulturen läßt sich kein toxisches Stoffwechselprodukt mehr nachweisen.

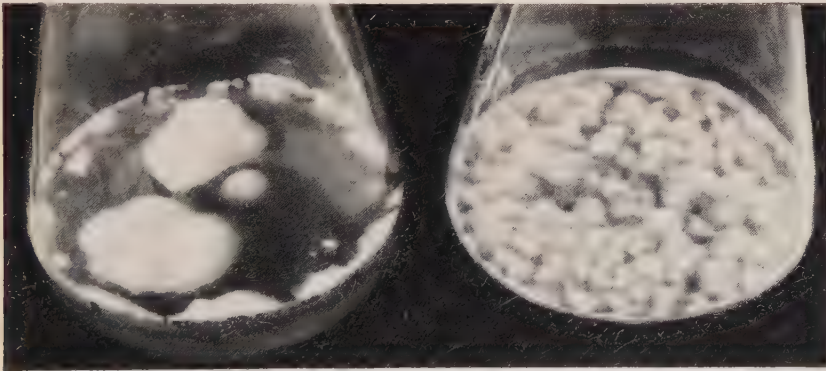


Abb. 30. Links *Fusarium lateritium* in Reinkultur, rechts in Mischkultur mit *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini*. Nährlösung Fries I (1 % Glukose).  $\frac{1}{2}$  nat. Größe

## 2. Mischkultur mit *Fusarium lateritium*

Bei diesen Versuchen kamen vor allem die Nährlösungen nach Fries I und Richard 5 zur Anwendung. Sowohl auf Fries I (1 % Glukose) als auch auf Richard 5 zeigt die Mischkultur ein verstärktes Wachstum (Abb. 30).

*Fusarium lateritium* bildet im Myzel den schwer wasserlöslichen toxischen Inhaltsstoff Enniatin. Das Kulturfiltrat wies im *Ustilago*-Test keine, sein Extrakt im *subtilis*-Test höchstens eine geringe Aktivität auf. In Mischkulturen mit *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* konnte im Kulturfiltrat aber plötzlich eine große *Ustilago*-Aktivität nachgewiesen werden (Abb. 31).

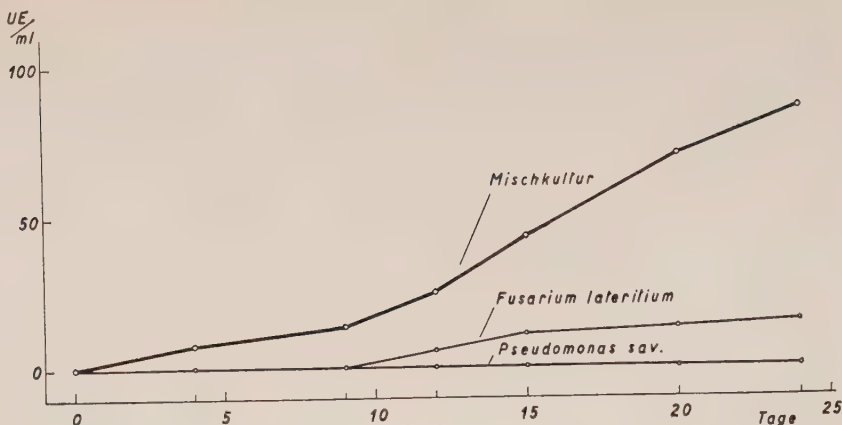


Abb. 31. Veränderung der *Ustilago*-Aktivität der Kulturfiltrate der Reinkulturen von *Fusarium lateritium*, *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* und ihrer Mischkultur auf Nährlösung Richard 5 bei 20° C.

Ordinate: UE/ml Kulturfiltrat. Abszisse: Kulturdauer in Tagen

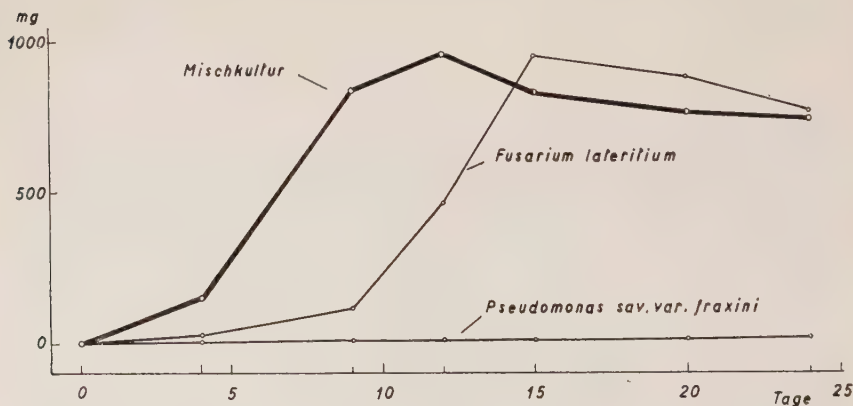


Abb. 32. Zeitliche Zunahme der Myzelgewichte von *Fusarium lateritium* in Rein- und in Mischkultur mit *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* auf Nährlösung Richard 5 bei 20° C.

Ordinate: Trockengewicht in mg, Abszisse: Kulturdauer in Tagen

Die Mischkultur zeigte eine mäßige bis starke Trübung durch Bakterien. Die pH-Werte der einzelnen Kulturen bei Versuchsende sind:

<i>Pseudomonas savastanoi</i> var. <i>fraxini</i>	pH 5,2
<i>Fusarium lateritium</i>	pH 6,8 (Anfangs-pH 5,6)
Mischkultur	pH 6,0

Die Myzelgewichte sind in Abb. 32 dargestellt.

Für das Auftreten dieser *Ustilago*-Aktivität gibt es verschiedene Möglichkeiten. Denkbar wäre, daß Enniatin durch *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* ab- oder in eine neue wasserlösliche Verbindung umgebaut wird. Dafür spricht der Umstand, daß das Bakterium in Nährlösungen (Nährbouillon oder Richard 5), denen vor dem Sterilisieren Enniatin zugesetzt wurde (10 mg/100 ml in Aceton gelöst), nicht gehemmt wird und daß diese Kulturen nachher eine geringe *Ustilago*-Aktivität aufweisen. Diese Ver-



suche bedürfen aber einer nochmaligen Überprüfung mit frisch isolierten Stämmen. In Versuchen mit alt isolierten geht die Aktivität verloren.

### 3. Mischkulturen mit *Plenodomus Rabenhorstii* Preuß.

In diesen Mischkulturen, die auf verschiedenen Nährlösungen durchgeführt wurden, zeigten sich zwischen Rein- und Mischkultur vor allem in der Morphologie (im Aussehen der Kulturen) Unterschiede. Die Myzelgewichte der Mischkultur sind gleich oder nur leicht höher als die der Reinkultur. *Subtilis*- oder *Ustilago*-aktive Stoffe lassen sich nicht feststellen. Als Beispiel diene Abb. 33.

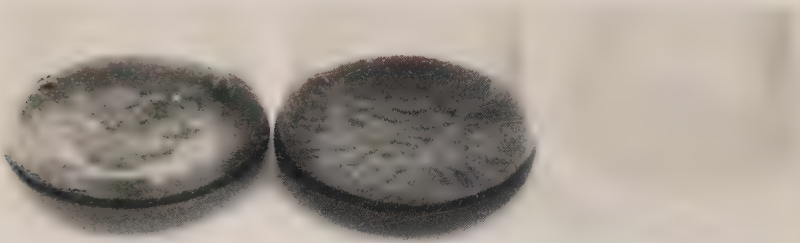


Abb. 33. Links *Plenodomus Rabenhorstii*, ganz rechts *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* in Reinkultur, in der Mitte die Mischkultur. Nährlösung Raulin. Nach 28 Tagen. Etwa  $\frac{1}{3}$  nat. Größe. Aufn.: Dr. Ch. STOLL, Inst. für spez. Bot. ETH

### B. Mischkulturen zwischen *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* und mehreren Pilzen

Diese Versuche wurden auf Fries I mit verschiedenen C-Quellen (1 % Glukose; 1 % Pektin; 0,5 % Glukose + 0,5 % Pektin; 0,5 % Glukose + 0,5 Methylzellulose) durchgeführt. Sie zeigen in allen Kombinationen ein um 30 bis 100 % erhöhtes Myzelgewicht in der Mischkultur. Als Beispiel diene Abb. 34.

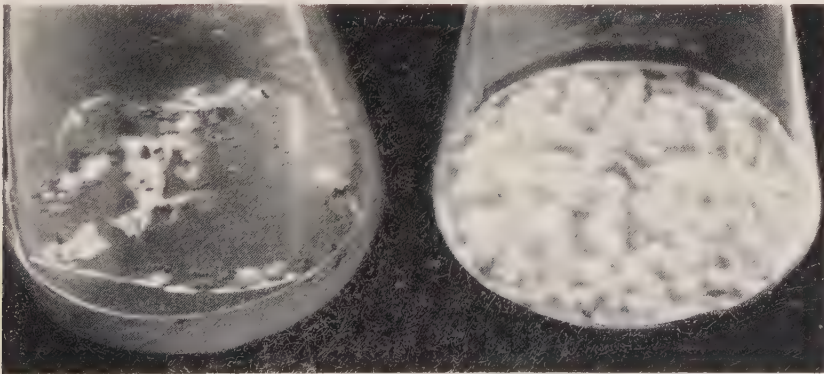


Abb. 34. Links Mischkultur von *Fusarium lateritium*, *Pleospora herbarum* und *Plenodomus Rabenhorstii*, rechts Mischkultur dieser drei Pilze mit *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* auf Nährlösung Fries I (1 % Glukose) nach 21 Tagen bei 20 ° C.  $\frac{1}{2}$  nat. Größe

Diese Steigerung des Myzelwachstums wird ausschließlich durch die Bakterien hervorgerufen und nicht durch Stoffe, die in der Bakterien-nährlösung vorhanden sind. Wird nur 1 ml einer sterilen Nährbouillonlösung zu den Kulturen pipettiert, so verändert sich das Wachstum gegenüber den unbehandelten Pilzreinkulturen nicht.

### C. Mischkulturen der Pilze

Die Mischkulturen der Pilze zeigen gegenüber den Reinkulturen nur wenige Veränderungen. Das Myzelgewicht steigt nicht. *Pleospora herbarum* bildet kein toxisches Stoffwechselprodukt.

### D. Besprechung der Ergebnisse

Die Untersuchung des Eschenkrebses zeigte, daß neben dem Primärerreger noch weitere Mikroorganismen an der Krankheit beteiligt sind. Im Gebiet des Kantons Zürich fand sich stets die gleiche Mikroorganismengesellschaft oder Mikroassoziation. Wie weit das für den Eschenkrebs anderer Gebiete zutrifft, ist eine Frage, die nicht untersucht wurde.

In den Mischkulturen übt *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* in verschiedenen Nährlösungen einen deutlich stimulierenden Einfluß auf das Wachstum der drei Pilze (*Fusarium lateritium*, *Pleospora herbarum* und *Plenodomus Rabenhorstii*) aus. Wird zu einer Mischkultur der drei Pilze das Bakterium hinzugefügt, wächst in erster Linie *Fusarium lateritium* wesentlich stärker. In Mischkulturen lassen sich entweder die biologisch aktiven Stoffwechselprodukte der Reinkulturen nicht mehr nachweisen, oder aber es finden sich neue, in den Reinkulturen unbekannte Toxine.

Worauf diese Unterschiede im Wachstum und in der Toxinbildung zurückzuführen sind (Wuchsstoffe, Enzymwirkungen usw.) bleibt noch zu untersuchen. Diese Versuche können auch nicht ohne weiteres auf die Verhältnisse in der Natur übertragen werden.

## 3. KAPITEL

### Die Infektionsversuche

#### § 1. Allgemeines

BROWN (1932) führte erfolgreiche Infektionsversuche mit *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* durch. Die ersten Symptome der Erkrankung wurden nach einem Monat, deutlich ausgebildete Krankheitsbilder nach vier Monaten sichtbar.

Da in den hier untersuchten Krebsgeweben nicht nur *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* allein, sondern immer die gleiche Mikroflorengesellschaft auftrat, wurden auch die drei Pilze in die Infektionsversuche einbezogen und somit Einzel- und Mischinfektionen durchgeführt.

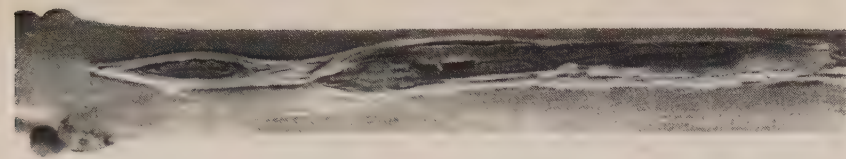
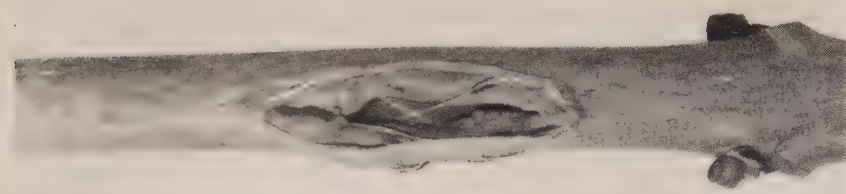
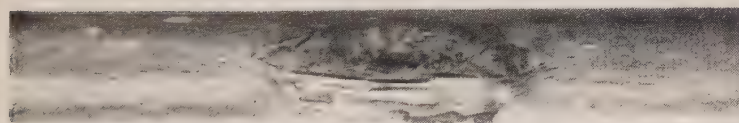
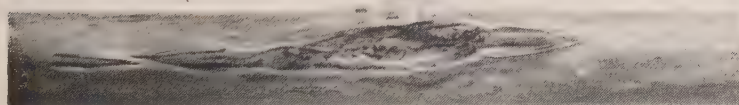
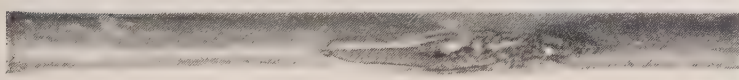
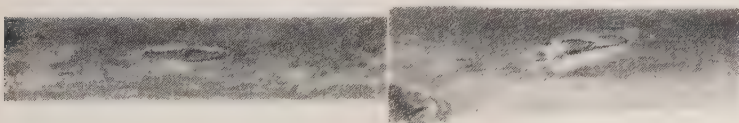


Abb. 35 (oben) u. 36

Abb. 37

Abb. 38

Abb. 39

Abb. 41

Abb. 40

Abb. 35. Kontrolle. Wundstelle im Jungtrieb, vier Monate nach der Injektion der sterilen Nährbouillonlösung. Mit sterilem dest. Wasser entsteht die gleiche Verwundung. Leicht vergrößert. — Abb. 36. Krankheitsbild an einem Jungtrieb, vier Monate nach der künstlichen Infektion mit einer Sporensuspension von *Pseudomonas Rabenhorstii*. Die beiden anderen Pilze erzeugen ungefähr gleich große Verwundungen. Leicht vergrößert. — Abb. 37 und 38. Krankheitsbilder an verschiedenen Jungtrieben, vier Monate nach der künstlichen Infektion mit einer Bakterienaufschwemmung von *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* (Gewächshausbedingungen). Leicht vergrößert. — Abb. 39, 40 und 41. Krankheitsbilder an verschiedenen Jungtrieben, vier Monate nach der künstlichen Infektion mit einem Gemisch von *Fusicium laterium*, *Pseudomonas Rabenhorstii* und *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* (Gewächshausbedingungen). Leicht vergrößert.



Echte Mischinfektionen liegen dann vor, wenn die verschiedenen Erreger ungefähr gleichzeitig in den Wirt eindringen. Bereitet ein Primärerreger das Substrat für die Folgeparasiten vor, so sprechen wir von einer Folgeinfektion. Beim parasitischen Erfolg von Mischkulturen mit verschiedenartigen Erregern sind drei Fälle (GÄUMANN, 1951) möglich:

- a) Die Erreger sind voneinander unabhängig, indifferent.
- b) Der Befallsgrad wird durch die Mischinfektion abgeschwächt.
- c) Der Befallsgrad wird durch die Mischinfektion verstärkt.

An Hand der Fußkrankheiten des Weizens beschrieb ZOGG (1950, 1951) den Einfluß der Mischinfektion verschiedener Erregerarten auf den Infektionserfolg. Je nach der Kombination von zwei Erregern tritt einer der drei möglichen Fälle auf. FLÜCK (1955) untersuchte im besonderen die Mischinfektion mit *Ophiobolus graminis* Sacc. und *Didymella exitialis* (Mor.) E. Müller. Durch Mischinfektion verschiedener Parasiten des Zitronenbaumes wie *Diplodia natalensis*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Diaporthe citri*, *Sphaceloma fawcetti* und *Phytophthora citrophthora* erreichte FAWCETT (1931) eine Steigerung der Erkrankung.

## § 2. Methode

Drei- bis vierjährige Eschenbäumchen wurden im Frühjahr nach dem Austreiben im Jungtrieb und Altholz mit einer der möglichen Erregerkombinationen und Reinkulturen an mehreren Stellen infiziert. Die Sporensuspensionen und die Bakterienaufschwemmung (siehe Seite 15) wurden einzeln oder als Gemisch unter die Rinde gespritzt. Zur Verwendung kamen die gleichen Stämme der Mikroorganismen wie in den Einzel- und Mischkulturen *in vitro*. Die Infektionsversuche wurden im Gewächshaus an eingetopften Bäumchen ausgeführt.

## § 3. Ergebnisse

Die ersten Krankheitssymptome zeigten sich im Jungtrieb durchschnittlich zwei Monate nach der Infektion ungeachtet ob mit Reinkulturen oder Mischkulturen infiziert wurde. Im Altholz mußte mit einer Verzögerung von durchschnittlich einem Monat gerechnet werden. Deutlich sichtbar wurde das Krankheitsbild aber erst nach vier bis fünf Monaten. Die Gewebewucherungen, die durch *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* hervorgerufen wurden, waren viel kleiner als die, die mit einer Mischinfektion aller vier Erreger entstanden (Abb. 35 bis 41).

## Zusammenfassung

1. Im Gebiet des Kantons Zürich wird der Eschenkrebs morphologisch, anatomisch und parasitologisch untersucht.
2. Neben *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* (Brown) Dowson werden stets drei Pilze, *Fusarium lateritium* Nees, *Pleospora herbarum* (Persoon) Rabenhorst und *Plenodomus Rabenhorstii* Preuß. festgestellt.
3. *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* bildet in Reinkultur eine subtilis- und welkeaktive Substanz, die als Rohextrakt gewonnen werden kann.
4. Das Temperaturoptimum für *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini*, *Fusarium lateritium* und *Pleospora herbarum* liegt zwischen 21 bis 24 ° C. Einzig *Plenodomus Rabenhorstii* hat ein höheres Optimum bei 27 ° C. Sein Wachstum ist wesentlich langsamer als das der anderen zwei Pilze.
5. *Pleospora herbarum* bildet unter bestimmten Bedingungen ein toxisches, welkeaktives Stoffwechselprodukt, das Pleosporin genannt wird.
6. *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* bewirkt in Mischkulturen mit einem oder mehreren der drei Pilze eine deutliche Steigerung des Myzelwachstums.
7. In Pilzmischkulturen mit *Fusarium lateritium*, die zugleich mit *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* infiziert wurden, wird vor allem *Fusarium lateritium* gefördert.
8. In den Mischkulturen läßt sich Pleosporin nicht mehr nachweisen.
9. In Mischkulturen von *Fusarium lateritium* mit *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* findet sich im Kulturfiltrat ein *Ustilago*-aktiver Stoff, der den Reinkulturen fehlt.
10. Zwischen den vier Mikroorganismen können keine Hemmungen beobachtet werden.
11. Die an drei- bis vierjährigen Eschen ausgelösten Krebswunden sind bei der Infektion (Gewächshausbedingungen) mit allen vier beschriebenen Mikroorganismen größer als mit *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* allein.

Meinem sehr verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. E. GÄUMANN, möchte ich für die großzügige Förderung dieser Arbeit meinen besten Dank aussprechen.

## Literaturverzeichnis

- BAVENDAMM, W., 1936: Erkennen, Nachweis und Kultur der holzverfärbenden und holz-zersetzenden Pilze. ABDERHALDEN, Handb. biol. Arbeitsmeth. 12, 927—1134.
- BERGEYS Manual of Determinative Bacteriology, 6. Aufl. 1948, 438 S., herausg. v. BREED, R. S., MURREY, E. G. D. and PARKER HITCHENS, A. The Williams & Wilkins Company, Baltimore.

- BRIAN, P. W., HEMMING, H. G., 1945: Gliotoxin, a fungistatic metabolic product of *Trichoderma viride*. Ann. Appl. Biol. **32**, 3, 214—220.
- BROWN, N. A., 1932: Canker of ash trees produced by a variety of the olive tubercle organism *Bacterium savastanoi*. J. Agr. Res. **44**, 701—722.
- BUCHANAN, R. E., and FULMER, E. I., 1930: Physiology and Biochemistry of Bacteria. Bd. 2, 1. Aufl., 709 S. The Williams & Wilkins Company, Baltimore.
- CAMP, A. F., 1923: Citric acid as a source of carbon for certain Citrus-fruit-destroying fungi. Ann. Mo. Botan. Garden **10**, 213—298.
- CIBA, 1940: Färbvorschriften für mikroskopische Farbstoffe. Bakteriologischer und Hämatologischer Teil. 36 S. Ciba, Basel.
- COOK, A. H., COX, S. F., FARMER, T. H., and LACEY, M. S., 1947: Production of Antibiotics by *Fusaria*. Nature **160**, 31—32.
- DAME, F., 1938: *Pseudomonas tumefaciens* (Sm. et Towns.) Stev., der Erreger des Wurzelkropfes, in seiner Beziehung zur Wirtspflanze. Cbl. Bakt., 2. Abt. **98**, 385—429.
- DOWSON, W. J., 1943: On the generic names *Pseudomonas*, *Xanthomonas* and *Bacterium* for certain bacterial plant pathogens. Transact. Brit. Myc. Soc. **26**, 4—14.
- EICHHOFF, W., 1881: Die europäischen Borkenkäfer. 1. Aufl., 315 S. Springer, Berlin.
- ELLIOTT, CH., 1951: Manual of Bacterial Plant Pathogens. 2. Aufl., 186 S. Waltham, Mass.
- ESCHERICH, K., 1923: Die Forstinsekten Mitteleuropas. Bd 2, 1. Aufl., 663 S. Paul Parey, Berlin.
- FAWCETT, H. S., 1931: The importance of investigations on the effects of known mixtures of microorganisms. Phytopathology **21**, 545—550.
- FLÜCK, V., 1955: Untersuchungen über die Pathogenität von Erregergemischen bei Getreidefußkrankheiten. Phytopath. Z. **23**, 177—208.
- FRANK, A. B., 1896: Die tierparasitären Krankheiten der Pflanzen. 2. Aufl., 263 S. Trewendt, Breslau.
- FREY-WYSSLING, A., 1949: Stoffwechsel der Pflanzen. 2. Aufl., 288 S. Büchergilde Gutenberg, Zürich.
- FRIES, N., 1938: Über die Bedeutung von Wuchsstoffen für das Wachstum. 1. Aufl., 188 S. Lundequistska, Uppsala.
- GÄUMANN, E., ROTH, ST., ETTLINGER, L., PLATTNER, PL. A., und NÄGER, U., 1947: Enniatin, ein neues, gegen Mykobakterien wirksames Antibiotikum. Experienta **3**, 202—203.
- — —, — — —, und — — —, 1950: Zur Gewinnung von Enniatinen aus dem Myzel verschiedener Fusarien. Phytopath. Z. **16**, 289—299.
- — —, — — —, und KOBEL, H., 1952: Über Fusarinsäure, ein zweites Welketoxin des *Fusarium lycopersici* Sacc. Phytopath. Z. **20**, 1—38.
- — —, 1949: Die Pilze, Grundzüge ihrer Entwicklungsgeschichte und Morphologie. 1. Aufl., 382 S. Birkhäuser, Basel.
- — —, 1951: Pflanzliche Infektionslehre. 2. Aufl., 681 S. Birkhäuser, Basel.
- GROVE, D. C., RANDALL, W. A., 1955: Assays Methods of antibiotics. 1. Aufl., 238 S. Medical Encyclopedia, New York.
- GWYNNE-VAUGHAN, H. C. I., BARNES, B., 1937: The Structure and Development of the Fungi. 2. Aufl., 499 S. The University Press, Cambridge.
- HODGSON, R., RIKER, A. J., and PETERSON, N. W., 1947: A Wilt-Inducing Toxic Substance from crown-gall bacteria. Phytopathology **37**, 301—318.
- JORDAN, E. O., and BURROWS, W., 1946: Textbook of Bacteriology. 14. Aufl., 909 S. Saunders Company, Philadelphia and London.
- KERN, H., 1952: Über die Beziehungen zwischen dem Alkaloidgehalt verschiedener Tomatensorten und ihrer Widerstandsfähigkeit gegen das *Fusarium lycopersici* Sacc. Phytopath. Z. **19**, 351—382.



- KOBEL, F. 1951: Untersuchungen über toxische Stoffwechselprodukte von *Nectria cinnabarina* (Tode) Fr. Phytopath. Z. 18, 157—195.
- KUNZ, R., 1952: Die Wirkungsweise von *Bacterium solanacearum* E. F. S., dem Erreger der tropischen Schleimkrankheit des Tabaks, auf *Solanum lycopersicum* L. Phytopath. Z. 20, 89—112.
- LINSKENS, H. F., 1955: Der Einfluß der toxischen Welke auf die Blattausscheidung der Tomatenpflanze. Phytopath. Z. 23, 89—106.
- LUZ, G., 1934: Über den Stoffwechsel von *Fusarium lycopersici* und *Fusarium lini*. Phytopath. Z. 7, 585—638.
- MEYER, A., 1903: Practicum der botanischen Bakterienkunde. 1. Aufl., 157 S. Gustav Fischer, Jena.
- MÜLLER, E., 1951: Die schweizerischen Arten der Gattungen *Clathrospora*, *Pleospora*, *Pseudoplea* und *Pyrenophora*. Sydowia 5, 248—310.
- NAGER, U., 1948: Über die Chemie der Enniatine. Diss. ETH, 42 S. Birkhäuser, Basel.
- NEERGAARD, P., 1945: Danish Species of *Alternaria* and *Stemphylium*. 1. Aufl., 560 S. Munksgaard, Copenhagen.
- NOACK, F., 1893: Der Eschenkrebs, eine Bakterienkrankheit. Z. Pflanzenkrankh. 3, 193—199.
- OLIVEIRA, M., 1940: Inoculacoes experimentais com o *Bacterium savastanoi* E. F. Smith e o *Bacterium savastanoi* var. *fraxini* N. A. Brown. Agr. Lusitana 1, 88—101.
- OUDEMANS, C. A. J. A., 1923: Enumeratio Systematica Fungorum. Bd. 4, 1231 S. Nijhoff, Haag.
- PLATTNER, PL. A., und NAGER, U., 1947: Über die Chemie des Enniatins. Experientia 3, 325.
- —, — —, und BOLLER, A., 1948: Über die Isolierung neuartiger Antibiotika aus Fusarien. Helv. Chim. Acta 31, 594—602.
- —, — —, 1948 a: Über die Konstitution von Enniatin A. l. c. 31, 2192—2203.
- —, — —, 1948 b: Über die Konstitution von Enniatin B. l. c. 31, 665—671.
- RABENHORST, G. L., 1903: Kryptogamenflora. Bd. 1, Abt. 7, 1072 S. Kummerer, Leipzig.
- RATZBURG, J. T. C., 1868: Die Waldverderbnis. Bd. 2, 5. Aufl., 375 S. Nicolai, Berlin.
- RIGGENBACH, A., 1956: Über ein toxisches Stoffwechselprodukt von *Pleospora herbarum* (Persoon) Rabenhorst. In Vorbereitung.
- SACCARDO, P. A., 1898: Sylloge Fungorum. Bd. 13, 1340 S. Borntraeger, Berlin.
- SCHNEIDER-ORELLI, O., 1947: Entomologisches Praktikum. 2. Aufl., 237 S. Sauerländer, Aarau.
- SCHNEIDER, H., und ZIMMERMANN, A., 1922: Botanische Mikrotechnik. 2. Aufl., 458 S. Fischer, Jena.
- SCHOPFER, H. W., 1949: Plants and Vitamins. 1. Aufl., 293 S. Waltham, Mass.
- SIU, R. G. H., 1951: Microbial Decomposition of Cellulose. 1. Aufl., 531 S. Reinhold, New York.
- SMITH, C. O., 1922: Pathogeneticity of the olive knot organism on hosts related to the olive. Phytopathology 12, 271—278.
- SMITH, E. F., 1905: Some observations on the biology of the olive-tubercle organism. Cbl. Bakt. 2, Abt. 15, 198—200.
- —, 1913: Cancer in Plants. Proc. seventeenth Intern. C. of Medicine, 1—18.
- SORAUER, P., 1874: Atlas der Pflanzenkrankheiten. 5. Folge, Tafel 27. Paul Parey, Berlin.
- —, 1908: Handbuch der Pflanzenkrankheiten. 3. Aufl., 780 S. Paul Parey, Berlin.
- STALDER, L., 1951: Über Dispositionsverschiebungen bei der Bildung von Wurzelknöllchen. Diss. ETH, Phytopath. Z. 18, 376—403.
- STAPP, C., 1942: Die Virulenzsteigerung von *Pseudomonas tumefaciens* durch Titan. Zbl. Bakt. 2, Abt. 104, 395—401.

- STEINBERG, R. A., 1934: A study of some factors in the chemical stimulation of the growth of *Aspergillus niger*. Am. J. Botany **6**, 330—356.
- SUTER, H., 1939: Geologie von Zürich. 1. Aufl., 116 S. Leemann, Zürich.
- THOM, CH., 1930: The Penicillia. 644 S. Baillière, Tindall and Cox, London.
- VAN VLIET, J., 1931: Esschenkankers en hun bouw. Diss. Utrecht, 73 S. Hollandia, Baarn.
- VUILLEMIN, P., 1896: Quelques champignons arboricoles nouveaux ou peu connus. Bull. Soc. Myc. France **12**, 41.
- WOLF, F. A., and WOLF, F. T., 1947: The Fungi. Bd. 2, 538 S. Wiley & Sons, New York.
- WOLLENWEBER, H. W., und REINKING, O. A., 1935: Die Fusarien, ihre Beschreibung, Schadwirkung und Bekämpfung. 1. Aufl., 355 S. Paul Parey, Berlin.
- WOOLLEY, W. D., PRINGLE, R. B., und BRAUN, A. C., 1952: Isolation of the phytopathogenic toxin of *Pseudomonas tabaci*, an antagonist of methionine. J. Biol. Chem. **197**, 409—417.
- WOTHERSPOON, M., 1931: Stimulation phenomena in the growth of bacteria as determined by nephelometry. Am. J. Bot. **18**, 266—287.
- ZÄHNER, H., 1954: Über den Einfluß der Ernährung auf die Toxinempfindlichkeit von Tomatenpflanzen. Phytopath. Z. **23**, 49—88.
- ZOGG, H., 1950: Über Mischinfektionen des Getreides. Schweiz. Z. Pathol. und Bakteriologie, **8**, 574—579.
- —, 1951: Studien über die Pathogenität von Erregergemischen bei Getreidefußkrankheiten. Phytopath. Z. **18**, 1—54.

*Istituto di Patologia Vegetale dell'Universita' di Milano*

*Direttore Prof. E. Baldacci*

## **Ricerche sulla patogenicità e sull'epidemia di *Botrytis gladiolorum* nei gladioli**

di

M. SGANZERLA

*15 figure*

In questi ultimi anni anche molti floricoltore italiani hanno denunciato gravi danni alle loro coltivazioni di gladioli, sia sulle piante in campo, sia ai bulbi durante il periodo di riposo in magazzino. In entrambi i casi è risultato responsabile un unico agente patogeno: la *Botrytis gladiolorum* Timm. Va anche detto che il materiale d'impianto dei coltivatori italiani è nella quasi totalità di provenienza olandese.

### **Descrizione della malattia**

I sintomi dell'attacco da *Botrytis gladiolorum*, tanto sulle foglie ed i fiori quanto sui bulbi di gladiolo, sono stati già ampiamente descritti ed illustrati da diversi autori, ed in particolare da TIMMERMANS (1, 2), che descrisse la specie, e da BRUHN (3) in questa stessa rivista. Ricordiamo per l'Italia il lavoro di SCURTI (4) non citato dai precedenti.

I bulbi di gladiolo colpiti presentano, nella maggior parte dei casi, i tessuti ridotti ad un ammasso spugnoso, umido, di colore bruno, che si spappola alla minima pressione. Altre volte i bulbi si presentano come mummificati, con un peso specifico minore di quelli sani. In questo caso è frequente la formazione degli sclerozi del patogeno, che possono essere messi in evidenza togliendo i catafilli ricopritori. In altri casi i bulbi si presentano apparentemente normali; togliendo i catafilli non si nota alcuna lesione all'esterno; anche il colore del tessuto epidermico è perfettamente normale, ad eccezione di una piccola zona più o meno tondeggiante situata superiormente, in corrispondenza del punto ove sorgeva lo stelo, oppure inferiormente, alla base del bulbo, che presenta un colore bruno scuro. Esercitando però una forte pressione con le mani si può avvertire che l'interno del bulbo



cede, quasi vi sia al centro una zona vuota. Facendo una sezione trasversale, si può osservare al centro una zona più o meno vasta colpita da un marciume color bruno, umido, spugnoso, che tende ad espandersi verso la periferia. Facendo una sezione longitudinale di un bulbo colpito da marciume al cuore e che si trovi agli stadi iniziali dell'infezione, si osserva che questa può cominciare da due distinte direzioni: o dall'apice, dirigendosi prevalentemente verso la base, o dalla base con direzione prevalentemente apicale.

La *Botrytis gladiolorum* colpisce anche i gladioli, in campo, durante il periodo vegetativo. L'attacco si manifesta in vario modo e con vari gradi, a seconda del momento in cui avviene e a seconda se derivi dal marciume insito nel bulbo o da spore provenienti da piante vicine infette.

La sintomatologia varia notevolmente e si hanno diverse manifestazioni a partire dal momento dell'impianto. Così si può avere subito una fallanza delle nascite; altra manifestazione dell'attacco è un ritardo più o meno notevole dello sviluppo con formazione di piante esili, provenienti da gemme secondarie. Altre volte le foglie dapprima ingialliscono e poi imbruniscono, presentando delle caratteristiche macchie brune, prima che si sia formato il fiore. Se l'umidità è favorevole si formano anche le spore sui tessuti colpiti.

Altre manifestazioni si possono avere nei successivi periodi di vita della pianta ed infine un ultimo attacco può presentarsi terminata la fioritura, mentre la pianta si prepara ad andare in riposo e la sua recettività all'infezione aumenta, come meglio vedremo. In questo caso l'origine dell'infezione è rappresentata, con ogni probabilità, dai conidi formati sulle piante vicine infette.

#### Studio dell'agente patogeno

L'isolamento della *Botrytis gladiolorum* è generalmente facile ed in molti casi si possono ottenere direttamente colture pure, facendo prelievi dai diversi tessuti colpiti.

Il micelio, coltivato su agar-malto, pH = 6,5, a 24 ° C, in termostato, si presenta come un fitto feltro bianco che ricopre rapidamente tutto il terreno nutritivo, espandendosi in tutte le direzioni e raggiungendo anche un notevole spessore, tanto da occupare tutto lo spazio libero delle provette. Ai margini estremi del substrato, dove questo tocca le pareti della provetta, il micelio, invecchiando, presenta una zona color bruno scuro che nel suo insieme appare come un bordo pressochè continuo. Il colore bruno appare altresì in alcuni punti nei quali il micelio è a contatto con la provetta, formando delle macchie più o meno estese (fig. 1—2).

Osservato al microscopio, il micelio presenta alcune ife di circa 2  $\mu$  di diametro, con le pareti sottili, ricche di protoplasma, settate, altre ife sono invece più grosse, di 6—7  $\mu$  di diametro, ramificate. Il decorso è rettilineo o lievemente incurvato. Invecchiando la coltura, si osserva che il feltro bianco diminuisce di volume, assumendo un colore bruno, mentre prendono origine diversi sclerozi color nero lucido, più o meno oblungi, con la superficie liscia ed irregolare, di lunghezza variabile dagli 1 ai 4 mm.

Tenendo le provette a 2 °C, il micelio si sviluppa molto lentamente, presenta dimensioni ridotte, non forma le caratteristiche zone bruno scure, non dà luogo a formazione di sclerozi. Conservando invece le colture a temperatura ambiente (15—18 °C) si ha un decorso perfettamente regolare, con formazione di sclerozi, come le colture tenute a 24 °C.



Fig. 1. Sviluppo del patogeno su agar-malto, pH = 6,8

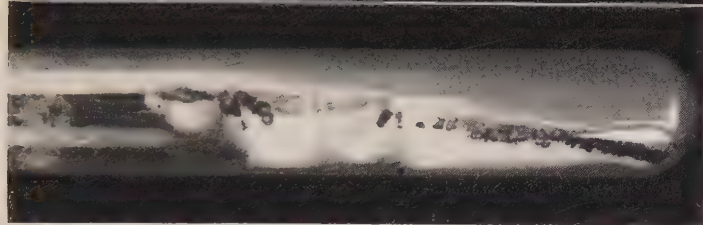


Fig. 2. Sviluppo del patogeno su agar-malto, pH = 6,8

Una complicazione, ai fini della diagnosi del fungo è data dal fatto che questo produce conidi con difficoltà. Allo scopo sono stati fatti alcuni tentativi coltivando il fungo su Czapek normale e su agar-patata ma senza esito e su agar-gladiolo, preparato spappolando 100 grammi di bulbi di gladiolo perfettamente sani in 400 cc di acqua, filtrando ed aggiungendo 250 cc di una soluzione di agar al 5 %. Il terreno è risultato avere un pH = 6,7.

Su questo substrato il patogeno ha mostrato uno sviluppo rapidissimo, producendo abbondantissimo micelio in un tempo minore di quello impiegato sugli altri terreni, ma senza produrre conidi. Le caratteristiche di questo micelio sono un po' diverse da quelle del micelio formatosi su altri substrati; manca infatti il caratteristico bordo scuro limitato ai margini del feltro bianco; in diversi punti nei quali il micelio è a contatto con le pareti della provetta vi sono però le caratteristiche macchie scure dalle quali poi originano gli sclerozi (fig. 3).

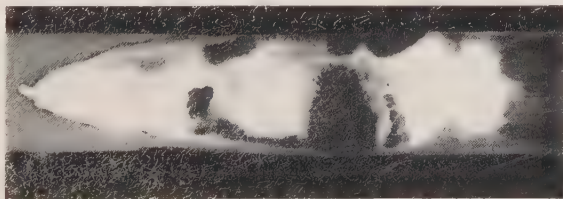


Fig. 3. Sviluppo del patogeno su agar-gladiolo, pH = 6,7

E' stato possibile ottenere la formazione di conidi per due diverse vie:

a) Sono stati usati dei grossi provettoni con agar-gladiolo inclinato; un vetrino è posto perpendicolarmente all'agar in modo che risultasse parzialmente coperto da un sottilissimo velo; fatto ciò è stato eseguito un trapianto di micelio dalle colture in provetta. Dopo circa 10 giorni, a temperatura ambiente, il micelio si è ramificato su tutto il vetrino. Esaminato in seguito al microscopio, abbiamo notato che la parte di esso priva del velo di agar-gladiolo ma ricoperta dal micelio fungino, presentava diversi rami conidiofori terminanti all'estremità in un caratteristico grappolo di conidi.

b) Sono stati sterilizzati in autoclave segmenti di foglie giovani di gladiolo sano, ponendoli in una camera umida sterile. Con una lancetta sterile è stata poi praticata una piccola incisione nelle foglie, mettendo a contatto con i tessuti recisi un po' di micelio prelevato dalle colture su agar-malto. Dopo 8—10 giorni, a temperatura ambiente, la superficie delle foglie si è ricoperta di rami conidiofori, sporgenti dal tessuto, che portavano all'estremità il caratteristico grappolo di conidi.

La lunghezza dei rami conidiofori variava molto: da circa 1 mm. a 2 mm. e più; il diametro è di 7—8  $\mu$ . I filamenti sono settati, di color bruno chiaro, con parete spessa, ricchi di protoplasma; verso l'estremità esterna si ramificano ed al termine di ogni ramificazione portano un grappolo di conidi ovoidali. Alcune volte i conidi sono inseriti lateralmente sul ramo conidioforo e sono isolati o formano piccoli grappoli. Si trovano inoltre numerosi microconidi incolori, inseriti anch'essi lateralmente al ramo conidioforo. I conidi sono incolori e per la maggior parte ovali, raramente sferici. Le dimensioni medie sono  $14,5 \times 10 \mu$  (media di 300 misurazioni), con rapporto tra lunghezza e larghezza uguale a 1,45; i microconidi misurano invece  $2 \times 3 \mu$  (media di 300 misurazioni) con rapporto tra lunghezza e larghezza uguale a 1,5.

Queste misure sono state messe a confronto con quelle presentate da conidi raccolti in campo, su piante ammalate; da una media di trecento misurazioni è risultato che la forma era uguale a quella dei conidi ottenuti in laboratorio ma le dimensioni leggermente superiori: in media  $16,6 \times 11,2 \mu$ , con un rapporto tra lunghezza e larghezza uguale a 1,48.

### Ospiti

E' stata tenuta in osservazione una coltivazione di gladioli attaccata da *Botrytis gladiolorum* nelle cui immediate vicinanze si trovavano piante di *Montbretia* (*Tritonia crocosmiaeflora*), *Acidantha* sp. e *Hypochaeris hybridum*.

In autunno, in condizioni climatiche favorevoli all'espansione della malattia, abbiamo notato sulle foglie di queste ultime specie varie lesioni, simili a quelle presentate dalle foglie dei gladioli, da cui è stato possibile isolare ceppi di *Botrytis*.



I risultati delle misure dei loro conidi in coltura sono esposti nella tabella 1, in confronto con quelle del gladiolo.

I conidi del ceppo isolato dalla *Tritonia* mostrano una forma diversa da quella dei conidi della *Botrytis* del gladiolo: sono in proporzione più stretti e lunghi, con un'estremità arrotondata ed una terminante quasi a punta.

specie	misura media
<i>Tritonia</i> .....	16 × 9
<i>Acidanthera</i> .....	10 × 6,3
<i>Hyppastrum</i> .....	10 × 6,3
<i>Gladiolus</i> .....	14,5 × 10

Non sono state effettuate inoculazioni incrociate e pertanto non possiamo pronunciarsi definitivamente, sebbene si abbiano ragione per ritenere che si tratti della stessa specie.

La *Tritonia* è stata già considerata ospite della *Botrytis gladiolorum* da TIMMERMANS, mentre BRUHN non ha isolato alcun ceppo di *Botrytis* dalla *Tritonia*.

### Riproduzione sperimentale della malattia

#### a) Infezione del bulbo

Siamo partiti da 40 bulbi sani e vigorosi di un'unica varietà: la Picardy, che sembra essere la più recettiva all'attacco da *Botrytis gladiolorum*. Ci siamo accertati della perfetta integrità di questi bulbi togliendo i catafilli ed ispezionando accuratamente tutta la superficie, provandone inoltre la durezza: essi erano omogenei, con i tessuti duri e compatti. Avendo iniziato queste prove nel mese di maggio, il germoglio centrale era già ben pronunciato e si è potuto constatarne la formazione sana e perfetta. Le radici erano già lunghe 2—3 mm. ed erano anch'esse perfettamente integre.

10 bulbi sono stati tenuti come controllo.

Altri 30 sono stati inoculati usando la seguente tecnica: in ciascun bulbo è stato praticato un piccolo foro del diametro di 3—4 mm, lunghezza 10—15 mm, partendo da un punto situato inferiormente, vicino alla zona d'emissione delle radici ma esterno ad essa, con direzione obliqua verso il centro del bulbo. In ciascun foro è stata introdotta una certa quantità di micelio di *Botrytis gladiolorum*, proveniente da colture giovani, cresciute su agar-gladiolo, in piena attività vegetativa. Abbiamo cercato di usare sempre la stessa quantità di inoculo, corrispondente a circa  $\frac{1}{3}$  del micelio totale sviluppatosi in provetta contenente circa 7 cc. di agar nutritivo inclinato. L'apertura del foro è stata poi chiusa con cera fusa.

I bulbi così preparati ed i bulbi di controllo sono stati messi uno per vaso, interrati in modo che superiormente al bulbo vi fosse uno strato di circa 5 cm. di terra, bagnati e tenuti in un luogo dove non vi erano gladioli colpiti da *Botrytis gladiolorum*. Le cure successive furono quelle usuali per la coltivazione del gladiolo, cioè acqua in abbondanza ed eliminazione delle erbe infestanti; nessuna concimazione fu somministrata.

Abbiamo avuto i seguenti risultati:

— 1<sup>o</sup>) Tre bulbi, sui trenta inoculati, non hanno dato luogo all'emissione di alcuna foglia ed esaminati dopo due mesi dalla messa in coltura presentavano i tessuti completamente distrutti, di color bruno scuro, analogamente ai bulbi colpiti da marciume in magazzino. — 2<sup>o</sup>) Otto bulbi hanno presentato all'inizio uno sviluppo apparentemente normale. Quando il germoglio principale ha raggiunto un'altezza di qualche centimetro, si è arrestato nello sviluppo, mentre lateralmente si è formato un secondo germoglio che ha dato vita ad una pianta esile e piccola. Inoltre, dopo un periodo variabile da 70—80 a 100—110 giorni, le foglie hanno cominciato ad ingiallire alla punta, l'ingiallimento è poi proseguito verso il basso mentre comparivano piccole macchie brune che al volte confluivano fra loro, dando origine a tacche allungate ed irregolari. Facendo prelievi dai tessuti di foglie che presentavano questi sintomi abbiamo ottenuto colture di *Botrytis gladiolorum*.



Fig. 4. Sintomi sulle foglie dell'attacco da *Botrytis gladiolorum*

— 3<sup>o</sup>) Quattro bulbi si sono comportati, all'inizio del germogliamento come quelli del caso precedente: il germoglio principale si è cioè arrestato a qualche centimetro di altezza mentre da una gemma laterale sorgeva un nuovo germoglio. Giunto all'altezza di 15—25 cm, anche questo nuovo germoglio si è arrestato nello sviluppo ed al suo fianco è apparso un terzo germoglio il quale ha dato vita ad una pianta debole e mal sviluppata. Dopo un numero di giorni presso a poco guale a quello del caso precedente, sono comparsi sulle foglie gli stessi sintomi già descritti sopra ed anche da queste foglie è stato possibile isolare la *Botrytis gladiolorum*.

— 4<sup>o</sup>) Tre bulbi hanno mostrato un germogliamento analogo a quello dei casi 2<sup>o</sup> e 3<sup>o</sup> ma ancora più complesso: il germoglio principale si è arrestato subito nel suo sviluppo, ne è spuntato un secondo che si è arrestato all'altezza di 15—20 cm, quindi un terzo che si è arrestato alla medesima altezza. E' germogliata allora una quarta gemma che ha dato vita ad una pianta esile e debole che ha presentato poi nelle foglie gli stessi sintomi descritti per i casi precedenti; anche da queste foglie è stato possibile isolare la *Botrytis gladiolorum*.

— 5<sup>o</sup>) Undici bulbi hanno invece presentato uno sviluppo apparentemente normale, dando vita ad una pianta vigorosa, con foglie verdi, larghe. Dopo un periodo variabile sempre da 70—80 a 100—110 giorni, si sono però verificati gli stessi sintomi descritti per i casi precedenti: l'apice delle foglie è cominciato ad ingiallire, si sono formate le piccole macchie brune

mentre tutta la pianta assumeva un aspetto clorotico; lo sviluppo si è arrestato e le foglie si sono seccate ripiegandosi su se stesse (fig. 4). Partendo da diversi punti dei tessuti colpiti è stata isolata la *Botrytis gladiolorum*.

Fig. 5. Sviluppo di tre piante di gladiolo dopo 40 giorni dall'impianto. A sinistra la pianta di controllo, proveniente da un bulbo non inoculato, il cui sviluppo è normale. Negli altri due vasi si trovano piante provenienti da bulbi inoculati ed il cui sviluppo è variamente ritardato



— 6<sup>o</sup>) Un bulbo ha dato origine ad una pianta in apparenza normale e che è rimasta tale fino al termine del ciclo vegetativo, formando un bulbo di dimensioni medie e perfettamente sano. Esaminando il vecchio bulbo inoculato, abbiamo notato che in prossimità del punto nel quale era stato introdotto il micelio vi era una piccola zona distrutta che però era rimasta localizzata, mentre la restante parte del bulbo era apparentemente sana ed integra.

In merito a queste prove, è da notare un particolare interessante: tutti i bulbi inoculati, ad eccezione del bulbo di cui al n<sup>o</sup> 6, hanno mostrato un ritardo più o meno notevole nel germogliamento, da 7 fino a 20 giorni rispetto ai controlli (fig. 5).

#### b) Infezione delle foglie

In un'altra serie di prove siamo partiti da piante sane, provenienti da bulbi vigorosi ed esenti da qualsiasi traccia di marciume, provocando infezioni sulle foglie nei loro diversi stadi di sviluppo. La tecnica usata è stata la seguente: prodotta con una lancetta sterile una piccola lesione sulla nervatura centrale della lamina fogliare, si introduceva nella ferita una certa quantità di micelio (senza agar). Nelle prime prove la zona dell'infezione veniva protetta mediante carta oleata ma in seguito, visto che la riuscita era ugualmente ottima, è stata eliminata anche questa protezione.

A distanza di diversi giorni dall'inoculazione, si può osservare che le foglie inoculate ingialliscono completamente, presentando delle tacche brune in tutto simili a quelle formatesi sulle foglie delle piante nei cui bulbi era stato inoculato micelio di *Botrytis gladiolorum*. In seguito anche le altre foglie della medesima pianta infettata ingiallivano, seccando e presentando



le caratteristiche macchie brune (fig. 6 e 7). Facendo prelievi in diversi punti di queste foglie abbiamo isolato la *Botrytis gladiolorum*, avendo in tal modo la dimostrazione che essa, introdotta in una sola foglia, era passata direttamente alle altre.



Fig. 6. Pianta di gladiolo sana nella quale dieci giorni prima era stata fatta un'inoculazione di micelio di *Botrytis gladiolorum*. Il punto dell'infezione è circondato da una zona bruno-scura che si vede in corrispondenza della freccia



Fig. 7. La stessa pianta a distanza di circa due mesi. Sono evidenti i sintomi caratteristici dell'attacco da *Botrytis gladiolorum*

Un esempio caratteristico di questa propagazione dell'infezione è dato dal caso di piante gemelle. Alcune volte da uno stesso bulbo si ha la contemporanea formazione di due germogli, presso a poco di uguale grandezza, capaci entrambi di portare un buon fiore. Questo fenomeno è tutt'altro che raro ed anche tre bulbi, sui 40 sopra indicati, lo hanno presentato. Sulle tre coppie gemelle è stata fatta una prova d'inoculazione scegliendo una sola pianta per coppia ed infettando una sola foglia. L'infezione ha presentato i sintomi normali, già descritti, nella pianta inoculata e poi, a distanza di circa trenta giorni, questi sintomi hanno cominciato ad apparire anche nell'altra pianta della coppia, da cui è stato possibile in seguito isolare la *Botrytis gladiolorum*.

#### Recettività della pianta di Gladiolo

In tutte le prove abbiamo notato che l'infezione non si è sviluppata sempre con la medesima velocità e con la medesima facilità. I tessuti giovani acquosi sono quelli che presentano la maggiore recettività, che più facilmente

vengono invasi e distrutti. Ciò è dimostrato dall'esperienza seguente: inoculando una giovane pianta di gladiolo nel punto indicato dalla freccia (fig. 8), si osservano, dopo venti giorni, le tre foglie lesionate come in fig. 9, una lamina fogliare è già ripiegata su se stessa avendo i tessuti della base completamente invasi da marciume.

Quando l'introduzione del micelio viene invece fatta su foglie vecchie, dure, robuste, allora l'infezione trova più difficoltà a progredire, giungendo nei casi estremi a provocare solo una macchia bruna più o meno larga intorno al punto d'inoculazione, macchia che resta localizzata mentre il rimanente della foglia e dell'intera pianta risultano in apparenza sane. Ciò accadeva specialmente quando le prove erano eseguite in coincidenza dei forti calori estivi, con temperature di 30 °C. e più. Queste piante restano con l'infezione localizzata fino al termine del ciclo vegetativo, dando fiori in apparenza normali. Prelievi fatti da diversi punti delle foglie e dei sepali apparentemente sani non hanno mai rivelato alcuna traccia del fungo.

In base a queste osservazioni e a queste prove d'inoculazione su piante sane, abbiamo tracciato la curva di recettività della parte aerea della pianta (fig. 10).

Sulle ascisse sono stati messi i vari stadi di sviluppo della pianta e sulle ordinate la recettività. Come unità di misura della recettività si è presa l'estensione delle macchie bruno-scuri che si formano intorno al punto d'inoculazione del micelio, in millimetri della loro lunghezza, 10 giorni dopo l'infezione.

Anche tenendo presente che l'inoculazione è sempre stata fatta con la medesima tecnica, usando sempre la stessa quantità di micelio ed introducendolo sempre nello stesso punto, a metà della lamina fogliare, non si può disconoscere che questa misura della recettività sia alquanto arbitraria. Essa è tuttavia confortata dall'aspetto generale della pianta, dal suo stato di sofferenza e di ingiallimento, che si sono mostrati in sufficiente proporzione con l'estensione delle macchie misurate.

La curva tracciata rispecchia l'andamento della recettività individuale. Questa aumenta rapidamente col progredire dello sviluppo fino a toccare un massimo quando sia stata emessa la terza foglia ed inizia a spuntare la



Fig. 8. Spiegazione nel testo Fig. 9. Spiegazione nel testo

quarta; in seguito la pianta si irrobustisce, i tessuti diventano duri, rigidi e la recettività diminuisce fino a toccare un minimo in corrispondenza della fioritura, quando il gladiolo è nel pieno vigore vegetativo. Proseguendo lo sviluppo, la pianta si prepara ad entrare in riposo e la recettività torna ad aumentare fino a toccare un nuovo massimo (minore però del primo) un poco prima del termine del ciclo vegetativo, momento nel quale le foglie disseccano e la recettività rapidamente si annulla. Ma prima di chiudersi il ciclo vegetativo, l'infezione può rapidamente progredire, la pianta non oppone più resistenza ed è facile che il fungo passi da un tessuto all'altro, proseguendo facilmente la sua marcia discendente verso il bulbo.

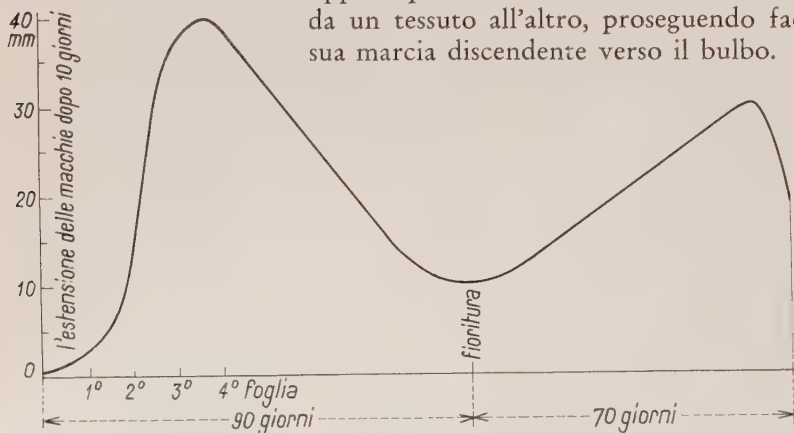


Fig. 10  
Spiegazione  
nel testo

Oltre al grado di vigore della pianta influiscono sulla recettività le condizioni ambientali ed in particolar modo la temperatura. Da prove da noi effettuate si conferma che l'optimum termico è compreso fra i 18° ed i 21° C., il minimum al di sotto dei 3° C. ed il massimo sopra i 31° C., operando le infezioni sulla quarta foglia.

#### Ciclo vitale, „Sistemicità” del patogeno nell'ospite e sua diffusione nel suolo

Dalle osservazioni esposte riteniamo di poter tracciare un quadro abbastanza completo sul decorso dell'infezione, chiarendo il comportamento della *Botrytis gladiolorum* ed il suo ciclo vitale.

In un bulbo infetto, la *Botrytis gladiolorum* è trasportata, probabilmente con la linfa ascendente, come dimostra la sintomatologia, nei tessuti dello stelo e delle foglie, le quali ingialliscono incominciando dall'apice, si ricoprono delle caratteristiche tacche brune e poi, quando l'umidità e la temperatura sono favorevoli, vi producono abbondanti conidi. Fin che il gladiolo è nel suo pieno vigore, l'umidità relativa dell'aria molto bassa e la temperatura vicina ai 30° C., l'infezione rimane prevalentemente localizzata sui tessuti colpiti ma quando si avvicina la fine del ciclo vegetativo e la recettività aumenta, allora il fungo procede verso il basso, in direzione del bulbo. Questo periodo coincide di solito con l'inizio dell'autunno e quindi con temperature più basse ed elevata umidità.



Nel frattempo il bulbo vecchio si è esaurito e sopra esso la regione del colletto si è ingrossata, dando origine al nuovo bulbo in continuo accrescimento. Essendo per la sua stessa origine in intimo contatto con lo stelo da una parte e con i residui del bulbo vecchio dall'altra, il bulbo di nuova formazione viene a sua volta infettato. La fig. 11 mostra una sezione longitudinale di un bulbo di gladiolo il cui apparato aereo presentava una forte infezione da *Botrytis gladiolorum*. Vi si può vedere il residuo del vecchio bulbo infetto, il bulbo di nuova formazione, il cui centro è invaso dal fungo, e la zona d'origine delle foglie, anch'essa infetta.

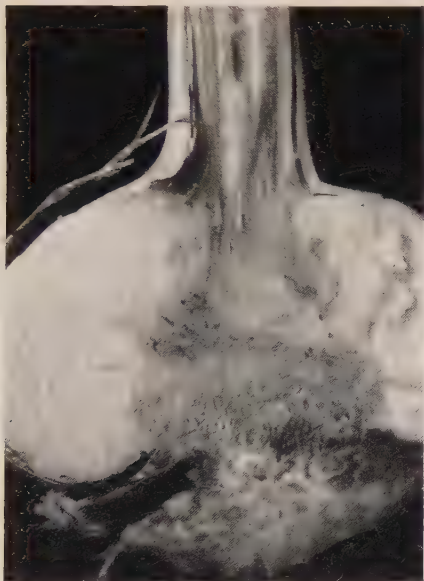


Fig. 11. Spiegazione nel testo



Fig. 12. Spiegazione nel testo

Osservando i bulbi di gladiolo durante il loro periodo di riposo, si può infatti notare come il marciume da *Botrytis gladiolorum* occupi generalmente il centro del bulbo, originando dalla zona apicale o da quella basale o da entrambe. Nel primo caso la causa dell'infezione è rappresentata da uno stelo marcescente. La fig. 12 mostra la parte superiore di un bulbo di gladiolo la cui parte aerea è andata completamente distrutta per un attacco da *Botrytis gladiolorum*; è perfettamente visibile al centro il punto da cui sorgeva lo stelo marcescente e che rappresenta la via d'ingresso della *Botrytis gladiolorum* nel bulbo. Nel secondo caso la causa dell'infezione è rappresentata dal vecchio bulbo esauritosi durante il precedente ciclo vegetativo. Ciò è rappresentato dalla fig. 13 che mostra la sezione di un bulbo di gladiolo il cui apparato fogliare presentava i sintomi di un forte attacco da *Botrytis gladiolorum*. La sezione è obliqua ed è stata eseguita in modo da mostrare su un unico piano la continuità del bulbo vecchio e di quello di nuova formazione. Il taglio è stato fatto partendo dalla metà del bulbo vecchio e procedendo in direzione obliqua, in modo da sezionare metà del bulbo di nuova formazione. Il punto di unione dei due bulbi è rappresentato

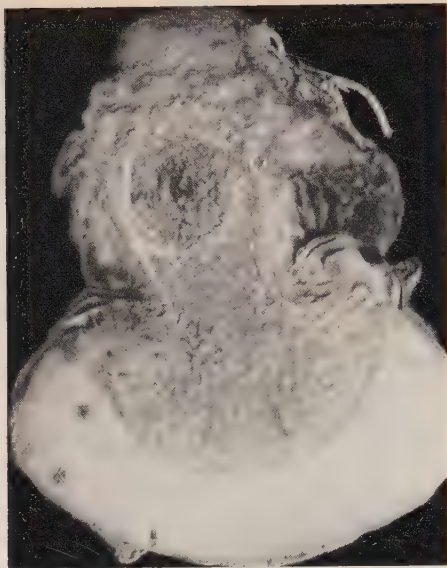


Fig. 13. Spiegazione nel testo

da una zona ristretta, nella quale originano alcune brattee, ben visibili nella fotografia.

Come si può chiaramente vedere, la zona colpita da marciume, proveniente dal bulbo vecchio, prosegue nel bulbo di nuova formazione e si espande in esso.

Se dal momento in cui l'infezione si è propagata, dallo stelo o dal bulbo vecchio, al bulbo di nuova formazione, passa un certo periodo di tempo sufficiente prima che quest'ultimo venga raccolto, la *Botrytis gladiolorum* può invadere tutti i tessuti e farlo completamente marcire nel terreno, riducendolo ad una poltiglia color bruno che ovviamente non è raccolta. Su questo substrato la *Botrytis gladiolorum* forma sclerozi (fig. 14), restando in

tal modo nel terreno, pronta a ripetere l'infezione su i gladioli che verranno piantati l'anno appresso o due anni dopo. Il terreno può rimanere così infetto. Anche per opera delle foglie di gladiolo invase dal fungo che cadono a terra e che non vengono raccolte si ha un'altra sorgente d'infezione del suolo. Su queste foglie morte avviene la formazione di sclerozi che, durante i lavori di preparazione per le successive colture, vengono ad essere inglobati nel terreno. Ciò è documentato dalla fig. 15 che mostra un segmento di foglia di gladiolo raccolto in campo, al termine del ciclo, ingrandito circa tre volte. Vi si può vedere come la superficie della lamina sia ricoperta da diversi sclerozi cilindrici, di colore nero, con lunghezza variabile fra  $1\frac{1}{2}$  mm. ed i 7—8 mm, ma sono stati trovati sclerozi lunghi fino anche a 10 mm.

Di solito queste formazioni si hanno di prevalenza vicino al colletto, nella regione in cui le foglie si inguainano fra loro, e si insinuano tra due lamine contigue in modo che ad un superficiale esame esteriore risultano invisibili.

Queste osservazioni sono in accordo con il consiglio di prevenzione dato da diversi autori: togliere presto i bulbi dal terreno e non attendere che l'inverno sia inoltrato. Questo consiglio è pienamente giustificato da due ordini di fatti: il primo è che l'infezione, quando proviene dalle foglie, entra nel bulbo solo dopo che la parte aerea è completamente distrutta, di modo che se si toglie la pianta dal terreno prima che la *Botrytis gladiolorum* sia scesa, eliminando subito dopo il colletto, il bulbo risulta sano; il secondo motivo è che la temperatura va continuamente diminuendo mentre l'umidità cresce, condizioni, queste, favorevoli alla malattia.

Riteniamo di avere così chiarito il ciclo di vita del fungo sulla pianta ospite. Si rivela una "sistemicità" del patogeno che migra dal bulbo alle foglie e da queste al bulbo; in più raggiunge il suolo e vi permane sotto forma di sclerozi.

L'epidemia appare condizionata, da quanto abbiamo esposto, a due ordini di fattori:

— 1° La permanenza degli sclerozi nel terreno, come è stato accennato.

— 2° La sporificazione conidica sulle foglie delle piante ammalate e l'eventuale trasporto su foglie di piante vicine, per opera di vettori ambientali.

A questo proposito abbiamo fatto le osservazioni seguenti: le piante adiacenti ad una pianta ammalata presentavano la seguente sintomatologia: all'inizio si hanno macchie puntiformi fino a 2—3 mm, numerose, isolate, di color bruno o bruno-rossastro, spiccanti sul tessuto verde. Successivamente l'apice ingiallisce completamente e dissecca. I primi sintomi sopra descritti appaiono a distanza di circa 30—40 giorni dalla data di comparsa dei sintomi sulla prima pianta ammalata da cui ha preso inizio l'epidemia, se l'umidità e la temperatura sono favorevoli.

#### Conclusione e riassunto

E' stata isolata la *B. gladiolorum* isolata da bulbi di gladiolo. E' stata data una descrizione accurata della malattia sui bulbi e sulle piante nate da bulbi infetti. L'isolamento del patogeno è facile ma la sua sporulazione può aversi solo a seguito di particolari accorgimenti. Si osservano spore su vetrini infissi nell'agar e su foglie sterilizzate di gladioli; la formazione di sclerozi è invece consueta. Una *Botrytis*, probabilmente *Botrytis gladiolorum*, è

stata osservata anche sui seguenti ospiti: *Tritonia crocosmiaeflora*, *Acidanthera sp.*, *Hyppastrum hybrydum*. Usando colture con solo micelio è stata ottenuta la riproduzione sperimentale della malattia inoculando 30 bulbi sani e ottenendo sulle piante da questi formatesi tutti i vari aspetti della sintomatologia nota. Inoculando foglie di piante sane si sono pure ottenuti tutti gli aspetti patologici noti, compresi quelli del bulbo. Si è osservato che i tessuti giovani ed acquosi sono quelli che presentano la maggiore recettività. Assumendo come unità di misura della recettività l'estensione delle macchie,

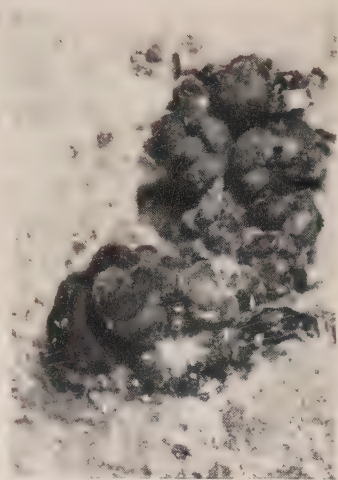


Fig. 14. Formazione di sclerozi su un bulbo di gladiolo completamente distrutto dalla *Botrytis gladiolorum*

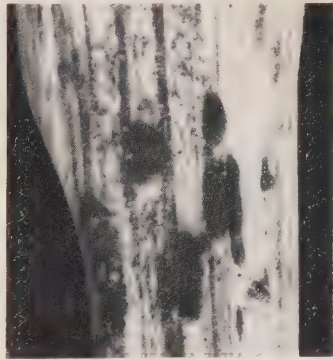


Fig. 15. Segmento di foglia di gladiolo sulla quale la *Botrytis gladiolorum* ha formato sclerozi



si è valutata la recettività nei vari stadi della vita della pianta. Si è trovata la massima recettività all'emissione della quarta foglia e prima del chiudersi de ciclo vegetativo della pianta. Da questa prova è risultato che il fungo passa dal bulbo alle foglie e viceversa. Il bulbo di nuova formazione può essere così infettato sia dal micelio proveniente dalle foglie, sia da quello proveniente dal bulbo. Il suolo di coltivazione può essere infettato sia da bulbi putrescenti, sui quali si formano sclerozi, sia dalle foglie rimaste in posto, sulle quali si formano pure sclerozi. Una sorgente d'infezione per le piante vegetanti è costituita dalla forma conidica del fungo, formatasi sulle foglie con sintomatologia tipica.

### Zusammenfassung

*Botrytis gladiolorum* Timm. ruft auf Blumenzwiebeln der Gladiole sowie auf den aus infizierten Zwiebeln hervorgegangenen Pflanzen eine Krankheit hervor, deren Erscheinungsbild beschrieben wird. Der Erregerpilz ist leicht zu isolieren; in Reinkultur bildet er stets Sklerotien. Hingegen kann er nur durch bestimmte Maßnahmen zum Sporulieren angeregt werden, so durch Kultivieren auf sterilisierten Gladiolenblättern oder auf Objektträgern, welche auf Agarnährböden gelegt werden. Ähnliche Pilze, welche möglicherweise mit *Botrytis gladiolorum* identisch sind, wurden auf *Tritonia crocosmiaeflora*, auf *Acidanthera* sp. und auf *Hyppeastrum hybridum* beobachtet.

Durch Inokulieren von Pilzmyzel auf gesunde Blumenzwiebeln konnte die Krankheit experimentell ausgelöst werden. Die aus künstlich infizierten Zwiebeln hervorgegangenen Pflanzen zeigten alle bekannten Krankheitsbilder. Erfolgreich war auch eine künstliche Infektion der Blätter. Am anfälligsten erwiesen sich die jungen, wasserreichen Gewebe, besonders beim Austrieb und vor Abschluß des vegetativen Zyklus.

Aus den Infektionsversuchen folgt, daß der Pilz von der Zwiebel in die Blätter dringt und umgekehrt. Sich neubildende Zwiebeln werden durch Myzel infiziert, welches aus kranken Blättern oder aus den alten Zwiebeln in sie hineinwächst. Weitere Infektionsquellen sind Sklerotien im Boden, welche sich entweder auf kranken, abgefallenen Blättern bilden, oder die von früherem Anbau im Boden vorhanden sein können. Bei der Übertragung der Krankheit von Pflanze zu Pflanze spielen die sich auf kranken Blättern bildenden Konidien die wichtigste Rolle.

### Bibliografia citata

1. TIMMERMANS, A. S., 1941: Het *Botrytis*-rot der Gladiolen veroorzaakt door *Botrytis gladiolorum* n. sp. Med. Lab. Bloembollenonderzoek 67, 1—32.
2. — —, 1942: *Botrytis gladiolorum* n. sp. de veroorzaker van het *Botrytis*-rot der gladiolen. Lab. Bloembollenonderzoek 71, 59—64.
3. BRUHN, C., 1955: Untersuchungen über die *Botrytis*-Krankheit der Gladiolen. Phytopath. Z. 24, 179—194.
4. SCURTI, J., 1953: Sulla *Botrytis gladiolorum* Timm. Annali della Sperimentazione Agraria. N. S. 9, (1) suppl: XCVII.

*Aus dem Institut für spezielle Botanik der Eidgenössischen Technischen  
Hochschule in Zürich*

*Direktor: Prof. Dr. E. Gäumann*

## **Der Einfluß des Lycomarasmin-Kupfer-Komplexes auf den Wasserhaushalt abgeschnittener Tomatensprosse**

Von

H. KERN

*Mit 3 Abbildungen*

Das *Lycomarasmin* (ein durch den Tomatenparasiten *Fusarium lycopersici* Sacc. gebildetes Welketoxin) schädigt Pflanzen unter anderem durch die Bildung von Schwermetallkomplexen (Chelaten; DEUEL, 1954). Wird *Lycomarasmin* abgeschnittenen Tomatensprossen verabreicht, bildet es offenbar im Stengel wasserlösliche Eisenkomplexe, welche mit dem Transpirationsstrom in die Blätter gelangen und dort wegen ihrer geringen Stabilität zum großen Teil wieder gelöst werden. Die Wirkung des *Lycomarasmins* beruht deshalb nicht nur auf dem Entzug von wirtseigenen Schwermetallen durch Komplexbildung, sondern auch auf einer Überschwemmung bestimmter Pflanzenteile mit Eisen. Das Ausmaß dieser Eisenvergiftung nimmt mit steigender Absättigung des verabreichten *Lycomarasmins* mit Eisen wesentlich zu (GÄUMANN, NAEF-ROTH und KERN, 1955).

In weiteren Versuchen (GÄUMANN und NAEF-ROTH, 1956) konnte gezeigt werden, daß Kobalt-, Nickel- und Kupferionen, die mit *Lycomarasmin* ebenfalls wasserlösliche, aber stabile Komplexe bilden, das *Lycomarasmin* mehr oder weniger stark zu entgiften vermögen; so beträgt die Welkewirkung des aequimolaren *Lycomarasmin*-Kupfer-Komplexes auf Tomatensprosse nur 18 % derjenigen des reinen *Lycomarasmins*.

Die vorliegende Arbeit verfolgt die Wirkung dieser stabilen *Lycomarasmin*-Schwermetall-Komplexe auf den Wasserhaushalt abgeschnittener Tomatensprosse. Als Beispiel wählten wir den aequimolaren *Lycomarasmin*-Kupfer-Komplex, da hier die Entgiftung am ausgeprägtesten ist; auf Grund orientierender Versuche kann angenommen werden, daß die Verhältnisse bei den andern in Frage kommenden Komplexen grundsätzlich gleich liegen. Die Versuchsmethode wurde von GÄUMANN und JAAG (1947) beschrieben.

**Versuchsfrage:** Wie verlaufen die an abgeschnittenen Tomatensprossen durch Lycomarasmin, durch Kupferchlorid ( $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ) und durch den aequimolaren Komplex dieser beiden Verbindungen ausgelösten Wasserbilanzstörungen?

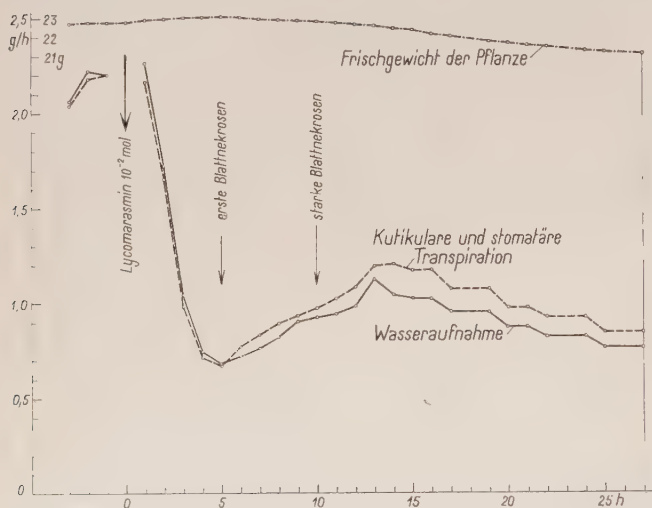


Abb. 1. Der Einfluß einer  $10^{-2}$  molaren Lycomarasminlösung bei dauerndem Nachschub auf den Wasserhaushalt eines Tomatensprosses im Licht. Frischgewicht des Sprosses zu Beginn der Gifzugabe 22,74 g, Frischgewicht am Versuchsende 20,93 g. Lufttemperatur 24,5 bis 25,0 °C, relative Luftfeuchtigkeit 50 bis 55 %. Abszisse: Stunden nach Übertragung in die Toxinlösung. Ordinate: Wasseraufnahme (bzw. Giftlösaufnahme), Wasseraufgabe und Frischgewicht der Pflanze

Die Abb. 1 bis 3 stellen die Ergebnisse einer typischen Versuchreihe dar. Die drei Pflanzen wurden gleichzeitig und unter praktisch identischen Bedingungen gezogen und vergiftet; sie waren ungefähr gleich groß und gleich schwer und setzten während der Akklimatisierung ungefähr gleich viel Wasser um. Aus den Kurven geht folgendes hervor:

1. Wie schon in früheren Versuchen gezeigt wurde (GÄUMANN und JAAG, 1947), folgen die durch reines Lycomarasmin ausgelösten Wasserbilanzstörungen dem Dreiphasentypus: auf eine rasche Drosselung des Wasserumsatzes (Schockphase) folgt eine Phase des Wiederanstiegs und anschließend eine langsam ausklingende Lähmungsphase. Im Beispiel der Abb. 1 ist die Erhöhung des Wasserumsatzes während der zweiten Phase relativ gering; in andern Versuchen steigt die Wasserabgabe (und in geringerem Maße auch die Wasseraufnahme) stärker an, in manchen Fällen sogar über die vor Gifzugabe gemessenen Werte hinaus (vgl. GÄUMANN und JAAG, 1947, S. 16).

Fünf Stunden nach Beginn der Gifzugabe treten die ersten schwachen Blattnekrosen auf; nach weiteren fünf Stunden zeigen die Blattspreiten zahlreiche stark nekrotische Flecken. Am Versuchsende sind die Blattspreiten nekrotisch-dürr und die Blattränder welk und schlaff. Die Wasserabgabe liegt vom Beginn der zweiten Phase an leicht über der Aufnahme; bis zum Versuchsende hat die Pflanze 1,81 g oder rund 8 % ihres Frischgewichtes verloren.

2. Kupferchlorid löst unmittelbar nach Beginn der Vergiftung eine starke Übersteigerung des Wasserumsatzes aus. Auf diese folgt



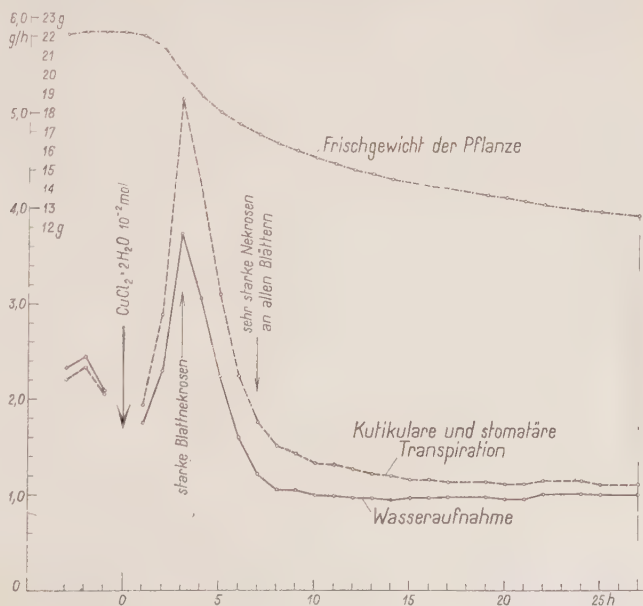
ein ebenso steiler Abfall, und anschließend daran bleibt der Wasserumsatz längere Zeit konstant. Schon drei Stunden nach Beginn der Giftzugabe zeigen alle Blätter starke nekrotische Flecken; nach weiteren vier Stunden sind alle Blattspreiten nekrotisch, dürr und braun verfärbt. Die Wasserabgabe liegt regelmäßig über der Aufnahme; bis zum Versuchsende hat die Pflanze 9,62 g oder rund 43 % ihres Frischgewichtes verloren.

Dieser Störungsverlauf entspricht grundsätzlich dem von KOBEL (1952) mit der gleichen Methode an Bohnen gefundenen; wieweit er in seinen Einzelheiten und im Ausmaß der Übersteigerung typisch ist, bleibt noch zu untersuchen.

3. Die durch den *a e q u i m o l a r e n* Lycomarasmin-Kupfer-Komplex ausgelösten Wasserbilanzstörungen folgen dem *Z w e i - p h a s e n t y p u s*, wie er von GÄUMANN, NAEF-ROTH und KERN (1955) für das reine Komplexon III beschrieben wurde: auf eine *S c h o c k p h a s e* mit raschem Rückgang des Wasserumsatzes folgt eine langsam verlaufende *L ä h m u n g s p h a s e*. Beim Abbruch des Versuchs nach 27 Stunden zeigt die Pflanze *keine Welkeerscheinungen*; ihr Frischgewicht hat nicht abgenommen, sondern ist etwas gestiegen (um 1,67 g oder rund 8 % des Frischgewichtes).

Diese Ergebnisse erscheinen durchaus verständlich. Wir gelangten ja in einer früheren Arbeit (GÄUMANN, NAEF-ROTH und KERN, 1955) zur Annahme, daß die Übersteigerung der Transpiration in der zweiten Phase durch im Übermaß freigesetztes Eisen verursacht wird; deshalb finden wir den Dreiphasentypus der Abb. 1 sowohl beim reinen Lycomarasmin (welches das Eisen im Stengel komplex bindet und in

Abb. 2. Der Einfluß einer  $10^{-2}$  molaren Kupferchloridlösung bei dauerndem Nachschub auf den Wasserhaushalt eines Tomatensprosses im Licht. Frischgewicht des Sprosses zu Beginn der Giftzugabe 22,27 g, Frischgewicht am Versuchsende 12,65 g. Versuchsbedingungen, Abszisse und Ordinate wie in Abb. 1



die Blätter transportiert) als auch beim aequimolaren Lycomarasmin-Eisen-Komplex und beim aequimolaren Komplexon III-Eisen-Komplex (bei denen der Pflanze mit der Giftlösung eine relativ große Eisenmenge verabreicht wird). In allen diesen Fällen werden die (in den in Frage kommenden Absättigungsbereichen) wenig stabilen Eisenkomplexe in den Blättern gelöst und wesentliche Eisenmengen freigesetzt.

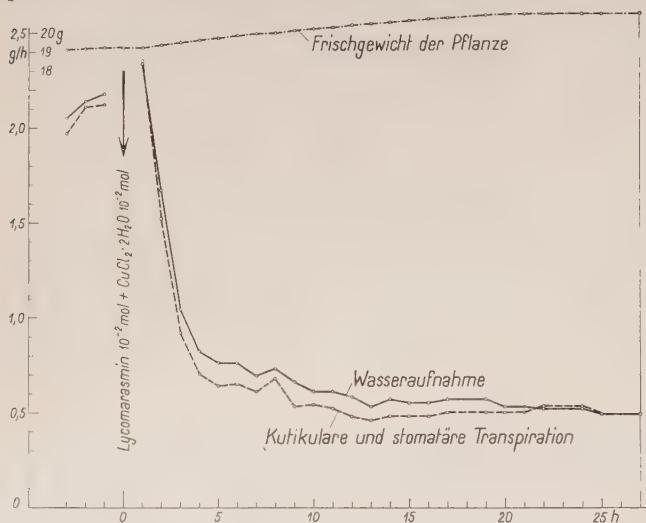


Abb. 3. Der Einfluß einer  $10^{-2}$  molaren Lösung des aequimolaren Lycomarasmin-Kupfer-Komplexes bei dauerndem Nachschub auf den Wasserhaushalt eines Tomatensprosses im Licht. Frischgewicht des Sprosses zu Beginn der Giftzugabe 19,20 g, Frischgewicht am Versuchsende 20,87 g. Versuchsbedingungen, Abszisse und Ordinate wie in Abb. 1

In derselben Arbeit wurde gezeigt, daß reines Komplexon III keine Übersteigerung des Wasserumsatzes verursacht, sondern einem Zweiphasentypus (ähnlich Abb. 3) folgt. Das reine Komplexon III bindet (wie das reine Lycomarasmin) im Stengel des Tomatensprosses Eisenionen; die entstehenden Komplexe sind jedoch (in dem hier vorliegenden niedrigen Absättigungsbereich) stabil, und es werden in den Blättern keine wesentlichen Eisenmengen freigelegt. Ähnlich liegen die Verhältnisse bei der Absättigung des Lycomarasmins durch Kupferionen. Der in die Pflanze eingebrachte aequimolare Lycomarasmin-Kupfer-Komplex ist stabil; das Lycomarasmin kann keine wesentlichen Eisenmengen aus dem Stengel in die Blätter verfrachten, und Eisenvergiftung und Übersteigerungsphase bleiben aus. Umgekehrt entgiftet das Lycomarasmin das Kupfer, und die Übersteigerung des Wasserumsatzes in der Anfangsphase der reinen Kupfervergiftung (Abb. 2) bleibt ebenfalls aus. Dagegen tritt die schockartige Drosselung des Wasserumsatzes in der ersten Phase beim Lycomarasmin und beim Lycomarasmin-Kupfer-Komplex ein; durch welche Eigenschaften des Lycomarasmins sie verursacht wird, läßt sich heute noch nicht entscheiden.

### Zusammenfassung

Die Wirkung des wasserlöslichen und stabilen Lycomarasmin-Kupfer-Komplexes auf den Wasserhaushalt abgeschnittener Tomatensprosse unter-

scheidet sich wesentlich von derjenigen des reinen Lycomarasmins. Durch die Absättigung mit Kupfer ist das Lycomarasmin nicht mehr imstande, im Stengel Eisen komplex zu binden und in die Blätter zu verfrachten; die Eisenvergiftung der Blätter und die damit verbundene Übersteigerung der Transpiration bleibt deshalb aus.

### Summary

The effect of the water soluble, stable lycomarasmin-copper-complex on the water balance of tomato cuttings differs considerably from the effect of pure lycomarasmin. In the copper-complex, lycomarasmin is no longer able to chelate iron in the stem and to carry it into the leaves; therefore, the iron intoxication and the consequent rise in the water turnover which may be observed with pure lycomarasmin do not occur with the lycomarasmin-copper-complex.

Den Herren Dr. E. HARDEGGER und P. LIECHTI vom Organisch-chemischen Laboratorium unserer Hochschule sei auch an dieser Stelle für die Isolierung des Lycomarasmins herzlich gedankt.

### Literaturverzeichnis

- DEUEL, H., 1954: Über Störungen des Spurenelementhaushaltes der Pflanzen durch Welketoxine. *Phytopath. Z.* **21**, 337—348.
- GÄUMANN, E. und JAAG, O., 1947: Die physiologischen Grundlagen des parasitogenen Welkens I. *Ber. Schweiz. bot. Ges.* **57**, 3—34.
- — und NAEFF-ROTH, St., 1956: Über die chelierende Wirkung einiger Welketoxine. IV. Die Verschiebungen der Toxizität durch steigende Absättigung mit verschiedenen Schwermetallionen. *Phytopath. Z.* **25**, 418—444.
- —, — — und KERN, H., 1955: Über die chelierende Wirkung einiger Welketoxine. III. Die Verschiebungen der Toxizität durch steigende Absättigung mit Eisenionen. *l. c.*, **24**, 373—406.
- KOBEL, H., 1952: Untersuchungen über den Einfluß des Kupfers auf die pflanzliche Transpiration. *l. c.*, **20**, 40—74.



*Research Institute for Medicinal Plants, Budapest*

## **Studies on the effect of ergot infection on rye and on toxic substances in the sclerotium**

By

A. ST. GARAY

*With 17 figures*

Without referring to those data which show the susceptibility to ergot of different races of rye and *Gramineae*, and the effect of rye extract in saprophytic culture, an attempt will be made to summarize in a few lines the results of researches concerning the relation between rye and ergot.

KREBS (1936) observed decrease of assimilates in rye infected by ergot. KIRCHHOFF (1929) has shown that ears of rye infected by ergot yield poorer kernels than the healthy ears. Some investigations have tried to show whether the fertilization of rye is of any importance in regard to infection. According to FALCK (1922) formation of honey-dew was found to be limited on unfertilized ears, and the development of sclerotia was abnormal, while such effects could not be observed by TSCHERMAK (1906) or KIRCHHOFF (1929). The latter proved, however, that susceptibility of rye to ergot was greatest at flowering. After 16 to 20 days following flowering, rye was not susceptible to infection at all. BÉKÉSY (1940) succeeded in proving that, if transport of assimilates is disturbed, the development of ergot is affected. Unconfirmed data of KREBS (1936) show that balanced fertilizer treatments increase the rye harvest as well as the ergot yield, on the other hand supply of potash fertilizer only increases the rye harvest, while the yield of ergot decreases. MOTHES and SILBER (1952) pointed out that fertilizer treatment is not essential in the cultivation of ergot. Although many, often contradictory, data are available, we lack reports of particular experiments concerning the relation between rye and ergot, although the study of this question is important from the practical as well as the theoretical point of view.

Our experimental work is divided in several parts. We examined in the first line the effects of ergot infection on the rye plant. Efforts were made to demonstrate the extraction of assimilates by the parasite, as well as changes in the respiration and enzyme-activity resulting under the influence of the infection. It was studied whether effects of the infection will extend to leaves more distant from the spot where the infection occurred. It is known

that rye-seedlings are not subject to ergot infection. Nevertheless we examined how the substances contained in the ergot sclerotium and acting on the rye will influence the germination of different rye varieties, respectively to what extent damage will be caused to the rye seedling by individual ergot strains. We considered therefore the development of an infectivity-test, but were not successful, as will be seen later.

The intensity of respiration and of peroxydase-activity observed under the action of the infection, and the decrease of the saccharase activity is, according to several authors, in relation with the resistance of the host plants. ARZICHOWSKAJA (1946) e. g. infiltrated the toxin of *Botrytis* sp. into cabbage leaves and noted that respiration and also peroxydase activity increased more in the resistant than in the susceptible variety. On the other hand saccharase activity decreased in the resistant host under the effect of the infection. I am not reviewing here the relative data, but refer the reader to the work of RUBIN and ARZICHOWSKAJA (1953), who very thoroughly studied the rôle of the enzymes in the host parasite relations. Then our work departed from the supposition that if from physiological and biochemical point of view the rye-seedling is resistant, the respiration and peroxydase activity ought to increase in it more under the influence of the treatment made with ergot extracts, than in the fully developed plant, whilst activity of the saccharase ought to decrease. As will be seen later we were successful to prove the correctness of our hypothesis. On considerations similar to the above, the activity of other oxydases was also measured in addition to that of the two enzymes.

Finally we dealt with the question if toxin contents are the same in the saprophyte culture, in the sclerotium, respectively in the capitula. By this we wished to obtain an answer to the question why ascospores are more infective than the conidia of saprophytic origin? In conclusion we discussed the question of the chemical nature of toxic substances contained in the ergot-sclerotium.

### I. Effect of infection with ergot on rye

**Material and methods.** The test plant was Petkus rye, the ergot strain: Hungarian 12. Conidia produced in saprophytic cultur were used for infection. The infection was carried out with BÉKÉSY's apparatus (1938) on a plot of 18 m<sup>2</sup>. The control plots — from which plants with secondary infections were removed — were situated next to the treated ones, in order to avoid any possible influence of the environment. The test-material was gathered at 9 o'clock in the morning. Before the investigation the fungus was removed from the ear, and only healthy-looking parts were used. For test always those leaf blades were used which were situated at the second node counted from the ear.

Reducing sugar was determined in the dry matter by the HAGEDORN method, and nitrogen by that of KJELDAHL. The fresh material have been ground in a mortar with pH 6.5 phosphate buffer in the proportion of 1 : 50. The peroxidase and catalase activity of the centrifuged juice was measured by the method of BELOSERSKY and PROSKURYAKOV (1951). To the extract obtained as described above (in the case of peroxidase 2.5 ml. and in the case of catalase 1 ml.), was added the substrate-solution. The action of the

enzymes lasted at room temperature 15 and 7 minutes respectively. Since we were primarily interested in the relative differences which appear between healthy and infected plants, we measured enzyme-activity in these plants under similar conditions and at the same time. Simultaneously respiration and assimilation were studied by the PAECH and SIMONIS (1952) methods using 1 g of fresh material. All measurements were made in quadruplicate.

**Results.** Results are shown in figs. 1 to 12. Honey-dew was observed from 9 to 17 days after infection, the shaclelia stage was reached between the 14<sup>th</sup>—29<sup>th</sup>, while formation of sclerotia started on the 23<sup>rd</sup> day.

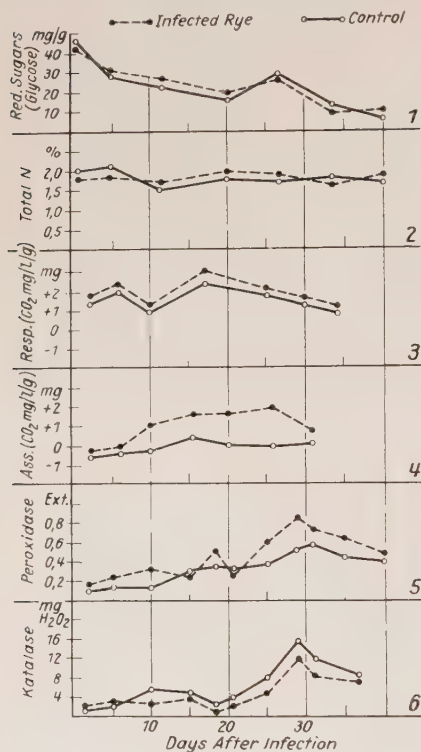


Fig. 1—6. Effect of infection with ergot on the ears of rye

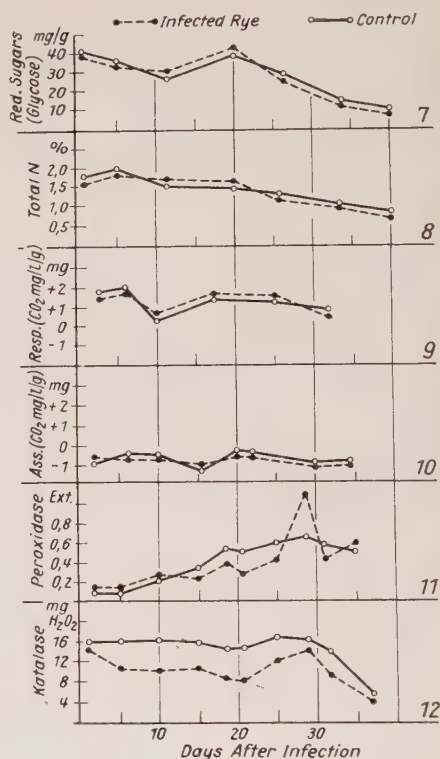


Fig. 7—12. Effect of infection with ergot on the leaves of rye

Concerning dry matter there was no difference between healthy and infected plants at measurements in three cases. The graphs show that there was no difference between healthy and infected plants in the content of reducing sugars (glucose) nor in the total nitrogen content or intensity of respiration. Graphs 10 and 4 show that the intensity of assimilation of the leaf was not changed as a result of infection, but that of the ears changed in such a sense that the respiration of infected rye even when exposed to light, exceeded assimilation. Peroxidase and catalase activity are markedly affected in the leaf. This effect, however, takes the form of increased fluctuation in enzyme activity in the infected plants rather than a consistent



change. Although attempts were made to ensure similar infections in the test plants, these attempts may, perhaps, not have been successful in all cases. Differences in infection, however, would be expressed in a greater range of individual measurements; the fluctuations noted in the extracts from infected plants must therefore be due to another factor. We may assume, that many of the contradictory data found in literature (RUBIN and ARZICHOWSKAJA 1953) may be accounted for in this way. It is noteworthy that similar measurements were also performed in 1952 and 1953, and in every year peroxidase showed the greatest fluctuations. In 1952 the peroxidase activity of the extract of the infected plants even exceeded that of the healthy plants by two points.

## II. Effect of sclerotium extract on rye seedlings

In the parts II, III, and IV of this discussion there will be given an account of experiments performed with a view of recognizing the toxic substances of ergot affecting rye. Many cases of parasitism show that the effect of fungus extract is injurious to germination or growth of host plants. Ergot is a suitable material for these experiments, because sclerotia in large quantities are available.

**Material and methods.** Pulverized ergot, Hungarian 12, was boiled for 5 minutes in distilled water in the proportion of 100 to 25, and was then filtered. 12 ml. of filtrate were poured into Petri-dishes 10 cm in diameter, with a double layer of filter paper, and on this Petkus rye was put to germinate at 20° C, in the dark. Most of the experiments for 4 days were performed in none-sterile conditions. Since, however, possible infections resulting from the high concentration of extract might cause disturbances, some experiments were carried out under sterile conditions (autoclaved for 20 minutes at 1 atm., the rye kernels being treated by Ca-hypochlorite). The control germination took place in tap water. The coleoptiles of four-days old seedlings were homogenized with pH 6.5 phosphate buffer in the proportion of 1 to 50. The activity of peroxidase, catalase and saccharase of the homogenisate was measured by the methods of BELOSERSKY and PROSKURYAKOW (1951), the activity of amylase was measured by that of SBARSKY (1950); of this extract, successive quantities of 1, 2, 2, 10 and 10 ml., were added to the substrate solution buffered with pH 6.5 phosphate. Peroxidase, catalase and polyphenoloxidase were measured at 20° C; the enzyme activity was brought to an end in case of the first two enzymes after 15 minutes, and in the case of the last after 24 hours. Saccharase activity was measured at 30° C after 90 minutes, that of amylase at 37° C after two hours. Reducing sugars were measured by the method of BERTRAND, intensity of respiration by the Warburg apparatus. Measurements were carried out five times in triplicate.

**Results.** Fig. 13 indicates the length of roots and coleoptiles of rye germinated on ergot extract of different concentration (in the dark for 4 days, at 20° C). Measurements performed under sterile conditions were similar to the data in the graph. Thus, ergot contains a substance inhibitory to the germination of rye. The extract is also inhibitory to germination of plants not susceptible to ergot, e.g. *Ricinus communis* L., *Sinapis alba* L., *Cucurbita pepo* L., *Amaranthus caudatus* L. A few data of experiments on such coleoptiles showing inhibition compared with controls in similar conditions germinated on water, are shown in table 1.

Table 1

The respiration, dry matter, content of reducing sugars, and activity of different enzymes of coleoptiles of rye germinated on water or ergot extract

	Coleoptiles of rye germinated	
	on water	on ergot extract 25 %
QO <sub>2</sub> .....	0,61	1,38
QCO <sub>2</sub> .....	0,62	1,36
% dry matter .....	9,7	13,6
Reducing sugars in glucose mg/g dry matter .....	184,0	103,0
Saccharase: invert sugar formed in mg glucose ....	20,5	7,8
Amylase: hydrolysed starch in mg .....	12,5	20,0
Polyphenoloxidase: Extinc. of purpurogallin formed	0,24	0,26
Peroxidase: Extinc. of purpurogallin formed .....	0,35	0,68
Catalase: H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> decomposed mg .....	4,0	7,20

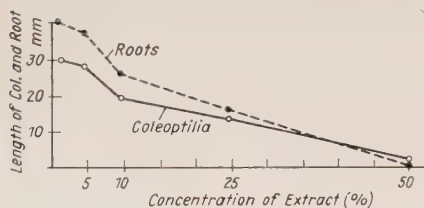


Fig. 13. Effect of ergot extract on germination of rye

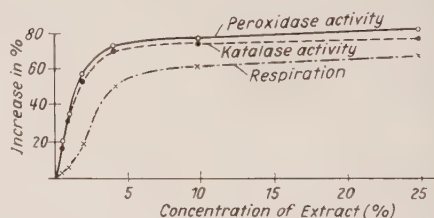


Fig. 14. The respiration, peroxidase and catalase activity of coleoptiles of rye seedlings germinated on ergot extract in different concentrations

The metabolism of the coleoptiles of rye seedlings germinated on ergot extract is generally more intense, inasmuch as their respiration, their peroxidase, catalase and amylase activity increases; polyphenoloxidase activity is not changed, and only in the case of reducing sugar contents and saccharase activity the figures are higher for the control plants than in the treated ones. If the figures for enzyme activity are converted to a dry matter basis (though the linear conversion according to Schütz's law may be taken only for information [MOELWYN-HUGHES 1950]), we obtain a slightly different figure. In this case, polyphenoloxidase activity is higher in the healthy plants. In the other enzymes results were only slightly modified. It remains to be noted that neutralization of 10 ml of extract of healthy and „infected“ seedlings immediately after preparation required 0,03 ml of 0,01 n NaOH (indicator: phenolphthalein); after standing for 18 hours at 20° C the extract of healthy plants required 0,8 ml, that of the „infected“ plants 2,1 ml. The extract of „infected“ seedlings becomes acid much more quickly than that of healthy plants.

Fig. 14 indicates the percentage increase in respiration and in peroxidase and catalase activity of rye coleoptiles germinated on ergot extract of

different concentration, compared with the control. In this case respiration was expressed in terms not of dry but of fresh material, in order to be compared with the changes in enzyme activity. As may be seen the curves for peroxidase and catalase almost coincide. But the respiration is not affected in the same proportion by the concentration of inhibitory substance. The fact, that peroxidase and catalase activity increase in inhibited plants in the presence of higher dilutions of the extract, intimates that the two enzymes mentioned are more sensitive to infection than is respiration. This is in accordance with the results mentioned: the peroxidase and catalase activity was modified in leaves of infected plants, while the respiration was not altered.

The changes recorded in treated seedlings are not similar to those recorded in plants infected by ergot. Increase of the respiration intensity was, for instance, observed in treated seedlings, while in infected rye it could only be shown, that in light, respiration exceeds assimilation. A more noteworthy difference appeared in connexion with catalase, the activity of which decreased in infected plants, but was increased in rye germinated on extract. This variation may very likely be connected with the fact that seedlings are not susceptible to infection by ergot. Nodes could be infected, but infections of seedlings with ergot conidia or with ascospores have not been successful, although repeated experiments have been carried out (STOLL and BRACK 1944). It is thus probable that the metabolism of the seedling differs from that of the flowering rye plant with regard to their susceptibility. The solution of this problem perhaps may be easier if the data in table 2 are studied. Ergot extract in different concentrations was added to coleoptile extract of healthy rye seedlings, and changes in enzyme activity were studied. The measurements of respiration intensity were carried out after infiltration with ergot extract at different concentrations.

It will be noticed that the activity of amylase and catalase was increased by addition of the ergot extract, whereas the effect on peroxidase was just contrary to that observed in the case of rye seedlings germinated on extract. There was no effect on respiration. From these data we may

Table 2

Effect of infiltrated ergot extract on respiration and enzyme activity in vitro of homogenate of rye coleoptiles

	Concentration of ergot extract in ‰				
	0,0	0,001	0,01	0,1	1,0
QO <sub>2</sub> .....	0,62	0,62	0,61	0,63	0,62
Saccharase: invert sugar formed in mg glucose ....	20,3	18,7	20,0	19,0	18,9
Amylase: starch decomposed in mg .....	50,0	50,0	50,0	65,0	75,0
Polyphenoloxidase: Extinc. of purpurogallin formed	0,48	0,48	0,45	0,47	0,49
Peroxidase: Extinc. of purpurogallin formed .....	0,35	0,34	0,35	0,30	0,00
Catalase: H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> decomposed mg .....	4,56	4,55	4,32	5,60	5,93



perhaps be able to conclude, as others have done in the case of other fungous diseases, that the changes in respiration intensity and the increase of peroxidase caused by infection (RUBIN and ARZICHOWSKAJA 1953) may be taken as a defence-reaction of the host plant and may be related to a possible process of detoxication.

### III. The inhibitory effect on germination of ergot extract, in connection with the infectivity of different ergot races and the susceptibility of different rye varieties

The following below deals with the question whether different ergot races might contain similar quantities of substances toxic to rye, and further whether the differences shown in the content of inhibiting substance might be brought into relation with the infectivity of the races.

**Material and methods.** Á. Kiss in Martonvásár provided the varieties of rye used, for which I wish to thank him here. Different races of ergot were obtained from the collection of N. BÉKÉSY. In their selection special attention was devoted to their alkaloid content, and to the origin of detached races, which are specially shown. It should be noted that most of the ergot races of different origin used are similar and may probably be accounted together; only albino, the red ergot named *rubescens*, and the ergot of Japanese origin differ to such a degree that they may be regarded as special races of *Claviceps purpurea*. It is noteworthy that the ergot named *rubescens* can be easily distinguished from sclerotia, altered by the red-coloured fungus disease of ergot. As already mentioned, a 25 % water extract was prepared and on this Petkus rye was germinated in the dark, at 20° C, for 4 days. Then the length of coleoptile and root was measured. From saprophytic cultures, from perithecia, as well as from sclerotia which had already formed perithecia, an extract (25 % on a dry matter basis) was prepared and the data obtained from this were compared with sclerotium extract (also 25 % on a dry matter basis). The harvest yields were given per acre as an average of 3 years, and the yield of the year 1953. The harvest yield from 2 or 3 plots of 36 m<sup>2</sup> was converted to acres. The total alkaloids were measured according to BÉKÉSY (1939) and expressed as ergotamine. This also was given as an average for 3 years, and also the figure for the year 1953. The control plants were again germinated on tap water. Measurement took place three times with tenfold replication.

**Results.** With the help of the method described above it was possible to prove that different ergot races contain different quantities of substances influencing rye germination. This is shown in table 3.

It may be seen that neither in the harvest yield — which is used to indicate susceptibility — nor in the alkaloid content there is any correlation with the effect of the extract on seedlings. It is noteworthy that among the races of ergot tested there are some which inhibit the growth of coleoptile only slightly, but simultaneously strongly inhibit the growth of roots (USA 96); on the other hand there are others which are more inhibitory to the coleoptiles and less disturbing to the growth of roots (*Rubescens*). Consequently, we are already able to conclude that ergot contains several substances with toxic effects on the coleoptile. This is shown in fig. 15. In this figure six pairs of columns indicate the effect on rye of the extract prepared from different states of ergot. During freezing the quantity of the substance effective to rye does not change, during formation of capitula the

Table 3

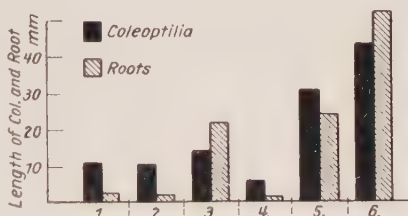
The effect of the extract of ergot from different sources on germination of rye compared with harvest results and alkaloid-content

Ergot of different sources	Harvest yields kg/acre		Alkaloid-content %		Length of	
	1953	1950 - 53	1953	1950 - 53	coleoptiles	roots
Hungaria .....	28,5	69,0	0,46	0,45	14,1	7,2
Hungaria .....	13,0	28,0	0,49	0,48	18,4	2,7
Hungaria .....	13,0	32,5	0,02	0,04	11,0	1,2
Switzerland .....	29,0	28,5	0,43	0,48	18,6	1,3
Spain .....	51,0	35,0	0,49	0,46	10,2	2,3
USA .....	27,5	32,5	0,55	0,52	14,9	0,0
Canada .....	19,0	35,0	0,60	0,57	12,9	1,2
Japan .....	13,0	55,5	0,53	0,48	13,9	1,2
Bohemia .....	40,0	36,0	0,21	0,21	7,8	0,0
Albino .....	19,0	27,0	0,13	0,21	10,0	0,9
<i>Rubescens</i> .....	22,5	23,5	0,49	0,41	11,8	16,8

toxic substances wander into the perithecia i.e. the extract of already „germinated“ sclerotia produces only a slightly injurious effect, while the extract of perithecia is strongly inhibitory. The effect of saprophytic culture was the slightest one. These data agree with the statements by KIRCHHOFF (1929) according to whom ascospores have a higher aggressivity than conidia of saprophytic origin.

Fig. 15. Effect of ergot extract from different forms of ergot on germination of rye

1. sclerotium extract
2. sclerotium after freezing
3. sclerotium after germination
4. capitula
5. saprophytic culture
6. control



The statement that in water extract of ergot there exists a factor which inhibits not only germination but also growth, will be proved as follows.

Table 4

Effect of ergot extract (Hungaria 12) on germination of different rye varieties

Rye varieties	Length of coleoptiles, mm						
	Asche	Balbo	Fleischmann	Kisvárdá	Petkus	Rosen	Sofia
Germinated in water	42	45	47	42	44	43	42
Germinated in extract	17	16	20	13	16	19	12

Isolated roots of wheat were cultivated on GAUTHERET's culture medium (1935) in the presence of 0,2 % ergot extract or without it. Fig. 16 indicates that growth was inhibited by the extract, despite the remarkably low concentration of extract used.

Table 4 shows the effect exerted on different rye varieties by extract of ergot (Hungarian 12).

The question, whether the more inhibited varieties might also be more susceptible, must provisionally be answered in the negative, though experiments are not yet completed; this will be discussed later.

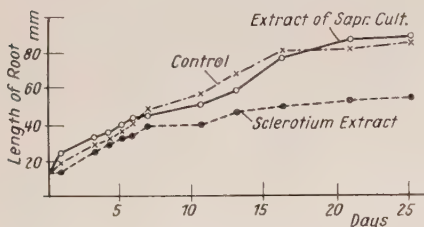


Fig. 16. Effect of ergot extract on the growth of excised wheat roots

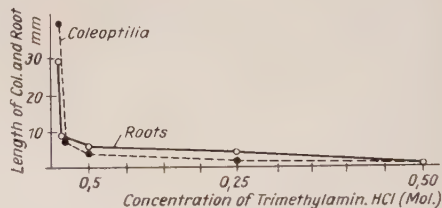


Fig. 17. Effect of trimethylamine hydrochloride on germination of rye

#### IV. The possible role of trimethylamine in the infection process

After having performed the experiments described above, I endeavoured to gather data regarding the chemical character of the substances toxic to rye. For this purpose, after methods based on the differences of solubility had proved unsuccessful, studies were carried out on fractionation, and after separation of proteins a substance inhibitory to rye seedlings was found in the fraction precipitated by phospho-tungstic acid. As is well known, many biogenic amines are precipitated with phospho-tungstic acid. Thus, it was necessary to test which of the biogenic amines already demonstrated in ergot was concerned in infection. Data will be presented indicating that trimethylamine may possibly play a role in infection.

Some of the data recorded in literature are worth mentioning, i. e. SCHAFFNIT and LÜDTKE (1932) attributed a toxic role to some biogenic amines, but trimethylamine was not especially tested. Some scattered data indicate that trimethylamine hydrochloride increases the activity of certain enzymes. Thus, according to SÖHNGEN (1911), the activity of lipase is increased; HEFFTER (1909) observed stimulation of saccharase activity, while ORIENT (1922—1924) pointed out that trimethylamine stimulates glycolysis in yeasts. Finally, according to FRENÝÓ (1950) the free base affects germination of *Ustilago* spores. Trimethylamine in ergot was discovered by WALZ (1852), and his results were confirmed by others.

**Material and methods.** Experiments were performed in the way already described in order to find whether trimethylamine and its hydrochloride might inhibit the growth of seedlings and also affect the activity of enzymes in coleoptile extracts, prepared as indicated above. Measurements were carried out on four occasions in triplicate.



**Results.** Fig. 17 indicates the measurements of roots and coleoptiles of rye seedlings germinating on solutions of trimethylamine hydrochloride at different concentrations. Table 5 presents the changes of enzymatic activity in coleoptile extract in the presence of different quantities of trimethylamine hydrochloride. The same table shows the intensity of respiration in the coleoptiles after infiltration with trimethylamine hydrochloride for 10 minutes.

Table 5

Effect of trimethylamine hydrochloride on respiration of infiltrated rye coleoptiles and on enzyme activity of homogenates

	Concentration of trimethylamine hydrochloride in Mol.				
	0,0	0,0001	0,001	0,01	0,1
QO <sub>2</sub> .....	0,60	0,60	0,66	0,79	0,81
Saccharase: invert sugar formed in mg glucose ....	20,4	20,0	19,5	19,7	16,5
Amylase: starch decomposed in mg .....	50,0	50,0	50,0	75,0	75,0
Polyphenoloxidase: Extinc. of purpurogallin formed	0,45	0,42	0,47	0,45	0,38
Peroxidase: Extinc. of purpurogallin formed .....	0,35	0,34	0,35	0,19	0,00
Catalase: H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> decomposed mg .....	4,32	4,39	4,30	3,30	1,12

It may be observed that, contrary to the results already mentioned, trimethylamine hydrochloride did not affect the activity of the saccharase extract; amylase and respiration were stimulated, to peroxydase and catalase it was inhibitory.

Comparing these results and the data on table 2 — which indicate the effect of ergot extract, — it is difficult to give an opinion. There is no doubt that the effect of the extract cannot be attributed to its trimethylamine content. Doubtless the extract may contain many other substances with other possible toxic effects. Finally the participation of trimethylamine hydrochloride as a toxin is supported by the circumstance that — as is well known — the free base penetrates quickly into the cell, while trimethylamine hydrochloride injures the cell-membranes of the bulb-scale epidermis cells of *Allium*, as will be shown below. *Allium* epidermis was placed for one hour in a solution of

0,5 M trimethylamine hydrochloride,  
1,0 M glucose, and  
10 % ergot extract,  
in distilled water;

then it was transferred to molar carbamide for one night. The next day the commencement of deplasmolysis could be observed, while cells treated with 60—80 % trimethylamine hydrochloride were already entirely deplasmolysed. In case of the latter, unlike the other controls, deplasmolysis was merely apparent, since new plasmolysis could not be obtained with solutions

of higher glucose concentration. By careful observation it was possible to see that the membranes of the epidermis cells were torn when placed in carbamide after a treatment with trimethylamine hydrochloride; the cells burst and their content flew out. In these injured cells of course new plasmolysis was not possible. These results may be compared with the observation by RUBIN and ARZICHOWSKAJA (1953) according to whom plant cells infected by certain fungi showed no plasmolyses.

It may be mentioned that in one set of the experiments I added trimethylamine hydrochloride in various concentrations to the conidia suspension used for infection. The yield did not increase under effect of the treatment, i. e. I did not succeed to demonstrate directly the participation of trimethylamine in the infection, however, on the ground of data above referred to we still consider possible that the trimethylamine should play some role in it.

### Discussion

Evaluation of the results reported is a difficult task. I am not able to present an unitary and convincing picture free of contradiction, because the results at present at our disposal are deficient and the collecting of data is still proceeding. However we summarise our conclusions as follows:

Although the effect of ergot infection is not a localized one but may be shown at places distant from the infection, decrease in dry matter is only observed in developing grains of infected ears. In the process of ergot infection, toxic substances participate which — even if only partly — exert inhibitory effects on the germination of rye and on the growth of roots and coleoptiles of seedlings. The fact that peroxidase activity and respiration *in vitro* were not increased by ergot extract, but that, on the other hand, peroxidase activity and respiration of rye seedlings germinating on extract were increased, shows that increase in activity of the enzymes mentioned and of the respiration following infection may well be attributed to a defence reaction of the host plant.

Although the toxicity of extracts of different races of ergot varies, this toxicity cannot be brought into relation with the susceptibility as indicated by harvest yields for several years. At the time of germination of ergot the overwhelming proportion of the toxic substances, especially these which act on the roots, wanders into the perithecia, possibly into the ascospores. Saprophytic cultivation yields comparatively small quantities of toxic substances, from which it may be concluded that in the formation of toxin by ergot the host plant is also somehow playing a role. It is interesting that amylase activity is stimulated by the ergot extract, considering that ergot does not contain amylase and cannot be cultivated on starch (KIRCHHOFF 1929), and thus cannot directly make use of the starch of the host plant. The physiological responses in infected rye are different to those of rye germinating on ergot extract. We may consider that this observation may be brought into

relation with the varying susceptibility of rye at different ages. It is noteworthy that the saccharase activity of the seedling decreases after a treatment with ergot extract. Knowing RUBIN's opinion — according to whom the changes in saccharase activity caused by infection may indicate resistance in many cases — we may see confirmed the view that the seedling is resistant not only histologically but also physiologically. Even by means of a hypodermic needle it was not possible to infect the seedling with ergot.

From the results it may be assumed that trimethylamine hydrochloride is involved in the infection process. This view is also supported by the fact, that trimethylamine occurs in numerous pathogenic fungi: *Tilletia laevis* Kühn, *Ustilago maydis* Tub., *Puccinia graminis* Pers. (WEHMER and HADERS 1933).

It is true that ergot contains trimethylamine in rather low concentration, but the possibility exists that it is formed during infection from choline, which occurs in greater quantities. Here we may refer to the results of CROMWELL (1950), according to whom several plants contain an enzyme which is able to separate trimethylamine from cholin. Such an enzyme could not be shown in rye.

### Summary

1. It was shown that the content of reducing sugars and total nitrogen and the intensity of respiration are not changed in leaves or ears of plants infected by ergot. However, the infected plant does not assimilate if exposed to light but respire. The activity of peroxidase extract prepared from leaves and ears shows marked fluctuations as a result of infection, in comparison with the control; catalase activity is decreased.

2. The water extracts of ergot inhibit growth of rye seedlings. The respiration of coleoptiles of rye seedlings germinated on extract is more intensive, the content of dry matter is higher, polyphenol oxidase activity is unchanged, that of saccharase is lower, and acidification occurs more quickly than in the control.

3. Infiltration with ergot extract does not increase the respiration of coleoptiles; it does not influence the saccharase and polyphenoloxidase activity of coleoptile extracts. Its effect on peroxidase activity is inhibitory, while the efficiency of amylase and that of catalase is stimulated.

4. Ergot races contain various toxic substances effective in seedling tests. These tests are, however, not suited to study the aggressivity of races.

5. The toxic substances of ergot wander into the perithecia at the time of germination of the sclerotia. Saprophytic cultures contain only small quantities of toxic substances.

6. Very probably trimethylamine plays a role in the process of infection. It may, on the one hand, be shown that the free base penetrates quickly and



that the hydrochloride destroys the cell membrane; on the other hand, if infiltrated it increases the respiration of coleoptiles and amylase activity. It does not affect saccharase or polyphenol oxidase; it is inhibitory to catalase and peroxidase.

### Literature cited

- ARZICHOWSKAJA, E. V., 1946: The physiology of *Botrytis-Brassica* complex. Mikrobiologija 15, 47.
- BÉKÉSY, N., 1938: Über parasitische Mutterkornkulturversuche. Zbl. Bakteriell., Parasitenk. u. Infektionskrh., II, 99, 321—332.
- —, 1939: Untersuchungen über den Alkaloidgehalt des Mutterkornes. I. Biochem. Z. 302, 187—197.
- —, 1940: Untersuchungen über den Alkaloidgehalt des Mutterkornes. II. Biochem. Z. 303, 368—382.
- BELOSERSKY, A. N. und PROSKURYAKOW, N. I., 1951: Praktitsheskoie Rukovodstvo po Biochimii Rastenij. Sow. Nauka. Moskwa.
- CROMWELL, B. T., 1950: The Micro-estimation and origin of Trimethylamine in *Chenopodium vulvaria* L. Biochem. J. 46, 578.
- FALCK, R., 1922: Über die Bekämpfung und die Kultur des Mutterkorns im Roggenfelde. Pharm. Ztg. 67, 77—79.
- FRENYÓ, W., 1950: Néhány alkilamin növényélettani szerepéről. Bp. Tud. Egy. Biol. Int. évkönyve 1, 88—94.
- GAUTHERET, R., 1935: Recherches sur la culture des tissus végétaux. Thèse Univ. Paris.
- HEFFTER, 1909: — —. Zbl. f. Physiol. 23, 295. Ref. in GUGGENHEIM, M., 1940: Die biogenen Amine. Karger, Basel.
- KIRCHHOFF, H., 1929: Beiträge zur Biologie und Physiologie des Mutterkornpilzes. Zbl. Bakteriell., Parasitenk. u. Infektionskrh., II, 77, 310—369.
- KREBS, J., 1936: Untersuchungen über den Pilz des Mutterkorns *Claviceps purpurea* Tul. Bern. p. 71—166.
- MOELWYN-HUGHES, 1950: Physical chemistry and chemical kinetics of enzymes. In: SUMNER, J. B. & MYRBECK, K.: The enzymes. Acad. Press New York.
- MOTHES, K. und SILBER, A., 1952: Über den natürlichen Befall der Roggenfelder durch Mutterkorn. Pharmazie 7, 310—313.
- ORIENT, J., 1922, 1924: Die Wirkung der Amine auf die Gärung. I.—III. Biochem. Z. 132, 352; 144, 353.
- PAECH, K. und SIMONIS, W., 1952: Übungen zur Stoffwechselphysiologie der Pflanzen. Berlin.
- RUBIN, B. A. und ARZICHOWSKAJA, E. M., 1953: Biochemische Charakteristik der Widerstandsfähigkeit der Pflanzen gegenüber Mikroorganismen. Akademie Verl. Berlin.
- SCHAFFNIT, E. und LÜDTKE, M., 1932: Über die Bildung von Toxinen durch verschiedene Pflanzenparasiten. Ber. d. Dt. Bot. Ges. 50, 444—463.
- SÖHNGEN, 1911: — — Verh. Koninkl. akad. v. Wetenschap. Amsterdam, is en Naturkd. Afd. 19, 1263. Chem. Zbl. (1911) I, 1708. Ref. in GUGGENHEIM, M., 1940: Die biogenen Amine. Karger, Basel.
- STOLL, A. und BRACK, A., 1944: Zum feldmäßigen Anbau von Mutterkorn. Pharm. Act. Helvet. 19, 118.
- TSCHERMAK, E., 1906: Die Blüh- und Fruchtbarkeitsverhältnisse bei Roggen und Gerste und das Auftreten von Mutterkorn. Deutsche Landw. Presse 33, 194.
- WALZ, G. F., 1852: Das flüchtige Alkaloid des *Secale cornutum*. Jb. prakt. Pharmazie 24, 242.
- WEHMER, C. und HADDERS, M., 1933: Systematische Verbreitung und Vorkommen der Amine. In: KLEIN, Hdb. der Pflanzenanalyse. Springer, Wien.
- ZBARSZKI, B. I. et al., 1950: Biokémiai gyakorlatok. Tankönyvkiadó Budapest.

*Aus dem Institut für allgemeine Botanik  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena*

*Direktor: Prof. Dr. Hans Wartenberg*

## **Untersuchungen über die schädigende Wirkung des Rhizoctonibefalles der Kartoffelstaude**

Von

J. HUBER

*Mit 5 Abbildungen*

Der Befall einer Kartoffelstaude mit *Rhizoctonia solani* (KÜHN) zeigt sich nicht nur an Symptomen im Bereich der unmittelbaren Infektion, sondern auch außerhalb derselben. Wenn eine Pflanze durch Rhizoctonibefall „fußkrank“ wird, dann treten Welkeerscheinungen auf, und an den Blättern entstehen Chlorosen. Oft sind die Blätter noch in bezeichnender Weise gerollt. Dabei ergeben sich Fragen nach dem Zustandekommen der Symptome der Krankheit in ihrem ursächlichen Zusammenhang und nach einer möglichen toxischen Fernwirkung des Pilzes.

Im Rahmen dieser Fragestellung beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit folgenden Problemen:

- a) Das Verhalten des Pilzes auf künstlichen Nährböden zwecks Feststellung seiner enzymatischen Wirkungen.
- b) Der natürliche Infektionsverlauf an erkrankten Kartoffelpflanzen.
- c) Die Eigenschaften der Kulturfiltrate des Pilzes.
- d) Testversuche mit abgeschnittenen Laubsprossen im Kulturfiltrat des Pilzes zur Feststellung des toxischen Effektes.

Der Pilz ist im Herbst 1954 von Kartoffelknollen isoliert worden. Hierbei wurden die der Kartoffelschale eng anliegenden Sklerotien abgekratzt, mit 2% Hydramonlösung desinfiziert und dann auf sterilen Malzagar in Petrischalen übertragen. Nach mehreren Passagen waren die Kulturen rein. Bei längerem Wachstum des Pilzes auf Malzagar konnte eine gelb-braune Verfärbung des Nährbodens beobachtet werden.

Es war notwendig, die „enzymatischen Fähigkeiten“ des Pilzes zu untersuchen, da in letzter Zeit von verschiedenen Autoren die Rolle von Enzymen beim Auftreten von Welkekrankheiten in Erwägung gezogen

wurde. DAVIS, WAGGONER und DIMOND (1953) u. a. haben dabei die Theorie entwickelt, daß durch die Pektinmethylesterase (PME) Produkte hydrolytischer Spaltungen von Stoffen entstehen, die in die Gefäße gelangen und diese verstopfen.

Zunächst wurde die pektinlösende Wirkung von *Rhizoctonia solani* untersucht. Nach der HOFFERBERT/ORTHSchen Methode (1951) ließ sich bestätigen, was die Autoren schon berichtet haben, daß der Pilz die Mittelamellen der Kartoffelknollen auflösen kann.

Es war noch die Frage zu beantworten, ob der Pilz Zellulose zu hydrolysieren vermag. HOFFERBERT und ORTH (1951) brachten Filterpapierschnitzel in Kartoffelsaftagar und beobachteten darauf eine Wachstumsförderung des Pilzes. Es wurde aber nicht festgestellt, daß die Zellulose vom Pilz aufgebraucht wird. Zu diesem Zweck wurde ein Zelluloseagar nach SCALES (1916) hergestellt und nach erfolgtem Sterilisieren mit *Rhizoctonia solani* beimpft. Schon nach mehreren Tagen zeigte sich ein deutliches Auflösen der Zelluloseflöckchen im Nährboden. *Rhizoctonia solani* hat also ein starkes Zellsystem, das sich der Pilz sozusagen leisten kann, weil er selbst keine Zellulosemembran sondern eine Chitinmembran besitzt. Die Mikroreaktion auf Zellulose war bezüglich der Membran negativ.

Es lag nun nahe, noch einen weiteren Versuch anzuschließen, der die Gelatineverflüssigung nachweisen sollte. Die Gelatineverflüssigung wurde bereits von K. O. MÜLLER (1924) beschrieben. Der Nährboden zu dieser Nachweisführung hatte folgende Zusammensetzung: 15 g Gelatine — Pharma VVB Labor-Chemie Apolda, 10 g Malzextrakt — Liebe/Dresden, 1 g Pepton — Witte/Rostock. Die Beimpfung der Petrischalen erfolgte, wie üblich, mit Sklerotien von Malzagarplatten. Schon am zweiten Tage der Beimpfung, bei einer Bebrütungstemperatur von 22 ° C war eine deutliche Verflüssigung der Gelatine unter den ausgewachsenen Hyphen festzustellen. Nach HALLMANN (1953) ist das Gelatineverflüssigungsvermögen eines Mikroorganismus ein wichtiges differentialdiagnostisches Merkmal, das auf das Vorhandensein trypsinartiger Enzyme schließen läßt.

Die hier in vitro beobachteten Fähigkeiten des Pilzes müssen auch an rhizoctoniakranken Pflanzen zur Auswirkung kommen. Es war deshalb notwendig, den Krankheitsverlauf einschließlich der auftretenden Symptome unter natürlichen Bedingungen kennenzulernen. Mit anderen Worten: Es war notwendig, den parasitären Effekt von einem vielleicht möglichen toxischen Effekt getrennt darzustellen.

Die Krankheiterscheinungen sind in der Literatur wiederholt ausführlich dargestellt worden. Meine eigenen Versuchsergebnisse stimmen mit denen der Literatur überein und brauchen daher nur kurz erwähnt zu werden.

Es werden sowohl Keime der auflaufenden Knollen als auch ältere Pflanzen befallen. Über den Befall der Keime sei gesagt, daß eine Infektion derselben durch Anbringen von hyphendurchwachsenen Agarstücken an den Keimen leicht möglich war. Schon nach einigen Tagen konnte man



die zerstörende Wirkung des Pilzes sehen. So traten z. B. wässrige Flecke auf, die sich rasch vergrößerten und zum Einsinken des befallenen Gewebes führten. An manchen Stellen ließ sich sogar beobachten, daß die Zerstörung des Gewebes bis in den Zentralzylinder hineingegangen war, was eine Totalfäule zur Folge hatte. An anderen Keimen hatten bevorzugt die Tribspitzen eine braune Farbe angenommen und wurden nekrotisch. RICHTER und SCHNEIDER (1950) erklären das Absterben der Keime als Folge der Ausbreitung des Pilzes in den Gefäßen in longitudinaler Richtung.

An Querschnitten von infizierten Keimen fand ich in der Längsrichtung des Sprosses raumgreifende Verstopfungen der Gefäße (Abb. 1).

Ob es sich bei den verstopfenden Stoffen um Stoffwechselprodukte des Pilzes oder um Substanzen der Wirtspflanzen, die durch Enzymwirkung des Pilzes transportabel geworden waren, handelt, ob es nur eine Myzelanhäufung war oder ob es sich um beides handelte, konnte nicht festgestellt werden.

An älteren Pflanzen zeigte sich, daß die Hyphen, die den Stengelgrund umgürtet

hatten, zu einer Vermorschung des Gewebes beitrugen. Derartige Erscheinungen ließen sich auch an den Stolonen und den Wurzeln wahrnehmen. Der Trieb war „fußkrank“ geworden. Hauptsächlich an jüngeren Blättern kamen Gelbfärbungen vor, die gewöhnlich mit einem Einrollen der Blattspreiten und teils mit roten und rotvioletten Verfärbungen verbunden waren. Es muß betont werden, daß das Krankheitsbild verschiedener infizierter Kartoffelpflanzen keineswegs einheitlich war, z. B. konnte das Wipfelrollen als Symptom auftreten, es brauchte aber nicht zu sein, obwohl die Infektion einwandfrei war.

Die Veränderungen an den Blättern und das Abwelken kranker Sprosse werden offenbar durch die lokalen Beschädigungen am Stengelgrund an den Stolonen und selbst an den Wurzeln begünstigt. Die Schäden an diesen Organen verursachen wahrscheinlich ein Verringern der Zuleitung von Wasser und Nährsalzen in die oberirdischen Pflanzenteile. Des anderen wird auch das Ableiten der Assimilate in entgegengesetzter Richtung behindert. Gerade diese Tatsache läßt sich nach BRAUN (1930) durch die Ausbildung von Luftknöllchen am Sproß veranschaulichen. Die behinderte Zu-

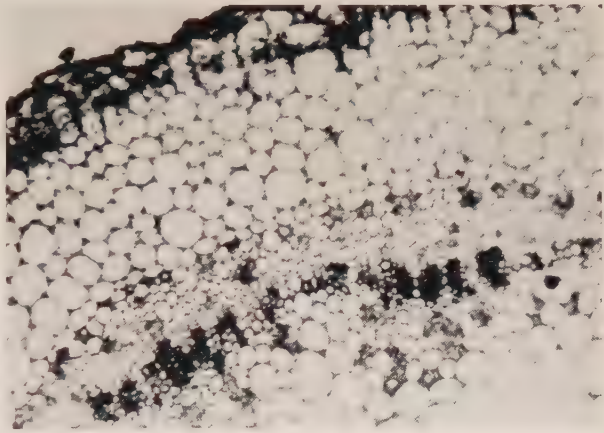


Abb. 1. Querschnitt eines infizierten Kartoffelkeimes mit Verstopfungen in den Gefäßen

leitung von Wasser und Nährsalzen kann in dreierlei Weisen verursacht worden sein:

1. Die Gefäße des Stengelgrundes und der Wurzel können von dem Pilz dadurch zerstört werden, daß er mit seiner Zellulase und Pektinase den Gewebeverband auflöst oder eine verderbliche Aktivierung der wirtseigenen Fermente hervorruft, die sozusagen zur Autolyse der Gewebe führen. Jedenfalls können hierdurch die Stoff- und Wassertransporte in der Pflanze erheblich gestört werden.
2. Es ist auch möglich, daß die Leitung von Wasser und Nährsalzen in den Gefäßen durch Verstopfung derselben mit eingedrungenen Pilzhypen oder deren Stoffwechselprodukten weitgehend unterbunden werden.
3. Schließlich ist es noch möglich, daß das Welken, Vergilben, Blattrollen usw. keine Folge der Zufuhrstörungen sondern eine primäre toxische Wirkung (toxische Fernwirkung) des Pilzes ist; und das Vermorschen am Fuße der Staude, die eigentliche Fußkrankheit, auf die verringerte Widerstandsfähigkeit des Wirtes zurückgeführt werden muß, der primär unter der Toxis zu leiden hatte.

Es galt zunächst festzustellen, ob der Pilz einen Stoff erzeugt, der auf die Laubspresse von Blütenpflanzen im Sinne eines Welketoxins wirkt, also ein Erschlaffen, ein Vergilben oder gar Nekrosen verursachen kann.

Toxine können bekanntlich mit dem Kulturfiltrat eines Pilzes getestet werden. Zu diesem Zweck hatte sich hier die Anzucht des Pilzes in einer Nährlösung nach CZAPEK-DOX (JANKE 1946) als günstig erwiesen, deren Konzentration auf 25 % des angegebenen Salzgehaltes vermindert wurde. Die Verminderung des Salzgehaltes erfolgte, damit während des Testens die osmotischen Gleichgewichte der Pflanze nicht gestört werden sollten. Nach BOLLER (1951) wirken nämlich anorganische Stoffe in einer Konzentration von  $10^{-2}$  bis  $10^{-3}$  m für Pflanzen bereits giftig. Der Nährlösung wurden 15 g Glukose je Liter zugesetzt. Darin wurde der Pilz etwa acht Wochen bei einer Temperatur von 24 °C kultiviert, wobei eine Abnahme der Wasserstoffionenkonzentration in der Nährlösung festzustellen war. Anfänglich hatte diese eine  $\text{cH}^+$  von pH 5,4, die sich im Verlaufe von acht Wochen auf pH 6,3 bis pH 6,6 veränderte. Die Hyphen, die von den eingimpften Sklerotien ausgewachsen waren, sahen zunächst schwach gelb aus und verfärbten sich im Verlaufe von zwei bis drei Wochen braun. Nach Ablauf dieser Zeit begann auch die Nährlösung eine braune Farbe anzunehmen, die sich mit der Kulturdauer verstärkte.

Nach acht Wochen wurde das Myzel durch Filtration von der Nährlösung getrennt und zunächst durch folgende Untersuchungen charakterisiert:

Die Glukose des Kulturfiltrates war, wie mit Fehlingscher Lösung nachgewiesen werden konnte, nicht restlos aufgebraucht.

Ammoniak konnte mit Neßlers Reagenz nicht nachgewiesen werden.

Bei Zugabe von Kalilauge zum Kulturfiltrat vertiefte sich der braune Farbton, konnte aber mit Salzsäure wieder aufgehellt werden.

Wurde Kaliumpermanganat zum essigsauren Kulturfiltrat hinzugegeben, so trat eine rasche Entfärbung des  $\text{KMnO}_4$  ein. Dagegen wurde Brom in Eisessig nicht entfärbt. Es waren also keine ungesättigten Kohlenwasserstoffe, Phenole und Enole nachzuweisen. Der Nachweis für phenolische und enolische Gruppen ließ sich aber auch nicht mit verdünnter Eisen-(III)-chlorid-Lösung führen.

Das Kulturfiltrat konnte mit Zinkstaub und Eisessig entfärbt werden. Diese Tatsache deutet auf das Vorhandensein von p-Chinonen des Benzols und Naphthalins hin. Andererseits ließ sich aber eine Chinhydronbildung nicht nachweisen. Der Versuch einer Reduktion mit Zinkstaub und Natronlauge (Nachweis für Anthrachinone) war ebenfalls ergebnislos.

Der braune Farbstoff des Kulturfiltrates war mit folgenden Lösungsmitteln nicht extrahierbar: Benzol, Chloroform, Benzin, Äther, Petroläther und Butylalkohol. Beim Ansäuern des Kulturfiltrates mit verdünnter Salzsäure ließ sich jedoch ein schwacher Übertritt des Farbstoffes in Äther und Petroläther wahrnehmen.

Der braune Farbstoff des Kulturfiltrates konnte mit einer Reihe anorganischer Kationen etwa im Bereich des Neutralpunktes ausgefällt werden. Zur Fällung besonders geeignet erwiesen sich neben  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{CdSO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{AgNO}_3$ , das Bleiazetat und das Bariumhydroxyd.  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$  schien am besten geeignet zu sein, da die überstehende Lösung nach dem Absitzen des Niederschlages wasserhell aussah. Bei Fällung mit  $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$  blieb die überstehende Flüssigkeit noch etwas braun gefärbt. Bei der Fällung des Farbstoffes muß es dahingestellt bleiben, ob es sich um ein direktes Aussalzen des Farbstoffes mit den anorganischen Kationen handelte oder ob es vielmehr bloß ein Mitreißen des Farbstoffes mit den schwer löslichen Sulfaten und Phosphaten war. Die Niederschläge, die sich während der Fällung mit Bariumhydroxyd und Bleiazetat gebildet hatten, waren braun und amorph. Man konnte sie in ihrem Aussehen mit gefällttem  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  vergleichen. Besonders bei der Fällung mit Bleiazetat war die Farbe etwas in das Trüb-Braune übergegangen. Offenbar ergab sich dieser Farbton aus der Vermischung des Farbstoffes mit dem schwer löslichen Bleisulfat und Bleiphosphat. Die Niederschläge mit Bleiazetat und Bariumhydroxyd ließen sich auf einem G4-Filter absaugen und konnten danach getrocknet werden. Die auf diese Weise erhaltene braune Substanz löste sich in Salzsäure, Essigsäure, Weinsäure und Sulfanilsäure. Dagegen war sie unlöslich in Wasser, Azeton, Formalin, Benzol, Benzin, Chloroform, Äther, Petroläther und Butylalkohol.

Das Kulturfiltrat wurde im Verhältnis 50 : 1 mit einer 3%igen Wasserstoffsuperoxydlösung versetzt und eine Stunde lang gekocht. Dabei wurde die Flüssigkeit bis zu einem schwachen Gelbstich entfärbt.

Für eine Dialyse fand der Elektroschnelldialysator nach BRINTZINGER Nr. 6390 des VEB Jenaer Glaswerk Schott & Gen., Jena, Verwendung. Die Dialyse wurde unter wiederholter Erneuerung des umspülenden dest.



Wassers auf 36 Stunden ausgedehnt. Dabei mußte festgestellt werden, daß der Farbstoff nicht dialysierbar war.

Mit Filtraten, die von Nährlösungen gewonnen waren, auf denen der Pilz acht Wochen mit guter Leistung gewachsen war, sind nachstehend beschriebene Testversuche ausgeführt worden.

Als Testpflanzen wurden Kartoffelsprosse benutzt. Es fanden Sproßspitzen Verwendung, die nur von gesund aussehenden Kartoffelpflanzen des Freilandes der Sorte Aquila und Capella entnommen wurden. Die Sproßspitzen waren etwa 15 bis 20 cm lang und besaßen neben den Sproßgipfeln fünf bis sechs spreitende Fiederblätter. Nach dem Abschneiden wurden die Sprosse sofort in Leitungswasser gestellt und durchschnittlich 12 Stunden akklimatisiert.

Die Testversuche sind in den Monaten August und September in einem Schuppen durchgeführt worden, der nach Norden und Osten offen war. Direkte Sonneneinstrahlung fehlte; Temperatur und Luftfeuchtigkeit wie im Freiland.

Nach dem Akklimatisieren der abgeschnittenen Kartoffelsprosse wurden diese einzeln in kleine Flaschen mit etwa 20 ml Kulturfiltrat gestellt. Gewöhnlich wurde morgens mit dem Testen begonnen. Am Abend des ersten Tages waren die Sprosse, die im Kulturfiltrat standen, etwas schlaffer als die Wasserkontrollen und die Kontrollsprosse in der Salzlösung. Nach Ablauf des zweiten „Welketages“ waren vor allem die unteren Fiederblätter der „Kulturfiltratsprosse“ mit den Blattstielen gewelkt und hingen schlaff herab. Am Morgen des dritten „Welketages“ — also nach insgesamt 48 Stunden — hatten die Fiederblätter und Blattstiele dieser am Vortage gewelkten Sprosse ihre Turgeszens wieder erreicht. Nach dem dritten Versuchstage waren nicht nur die unteren Blätter und die Blattstiele gewelkt, sondern die ganzen Sprosse, die im Kulturfiltrat standen, waren erschlafft (Abb. 2).

Am Morgen des vierten „Welketages“, d. h. nach genau dreitägiger Testdauer hatten sich die „Kulturfiltratsprosse“ während der Nacht zwar wieder etwas aufgerichtet, aber es zeigten sich deutliche Unterschiede gegen-

über den Kontrollpflanzen. Nach Ablauf dieser Zeit hatten vor allem die unteren Fiederblätter eine blässere Farbe angenommen. Blattnekrosen konnten nur selten beobachtet werden und erwiesen sich als nichttypisch.

Während der Pilz zur Gewinnung eines „toxinhaltigen Kultur-



Abb. 2. Links zwei Wasserkontrollen, rechts drei gewelkte Pflanzen im Kulturfiltrat

filtrates“ acht Wochen in der beschriebenen Nährlösung bebrütet wurde, standen in demselben Thermostaten Gefäße, die die gleiche unbeimpfte Nährlösung, aber ohne Zucker enthielten. Die „Nullparzelle“, d. h. die Lösung, die später als Kontrollösung Verwendung fand, wurde also steril mitbebrütet. Die Wasserkontrollen sind jeweils bei Beginn des Versuches mit frischem Leitungswasser angesetzt worden.

Der oben beschriebene Versuch wurde dreißigmal mit je sechs Wiederholungen in Kulturfiltraten und Kontrollen ausgeführt und hatte immer dasselbe Ergebnis. Die Sprosse im Kulturfiltrat welkten, während die Sprosse in den Kontrollösungen in derselben Versuchszeit nicht welkten. Das Welken war aber reversibel, tagsüber erschlafften die Sprosse, die im Kulturfiltrat standen und nachts bis zum anderen Morgen wurden sie wieder turgeszent. Mit der Zeit wurden sie schwach chlorotisch, erschlafften aber nie endgültig und wurden auch nicht in der für toxische Effekte typischen Weise nekrotisch.

Wie aus den beobachteten Erscheinungen zu entnehmen ist, handelt es sich nicht um ein toxigenes Welken der Kartoffelsprosse, da sich die Welke im Tages- und Nachtrhythmus als reversibel erwiesen hat. Das toxigene Welken ist ja durch seine Irreversibilität charakterisiert.

Aus der reversiblen Welkeerscheinung ergab sich die Frage nach ihrer Ursache. Zu ihrer Beantwortung wurden die Sprosse nach Abschluß des Welkeversuches quer geschnitten und mikroskopisch untersucht. Dabei ließ sich unschwer eine auffällige Verstopfung einzelner Gefäße oder ganzer Gefäßgruppen mit einer braunen Substanz wahrnehmen (Abb. 3).

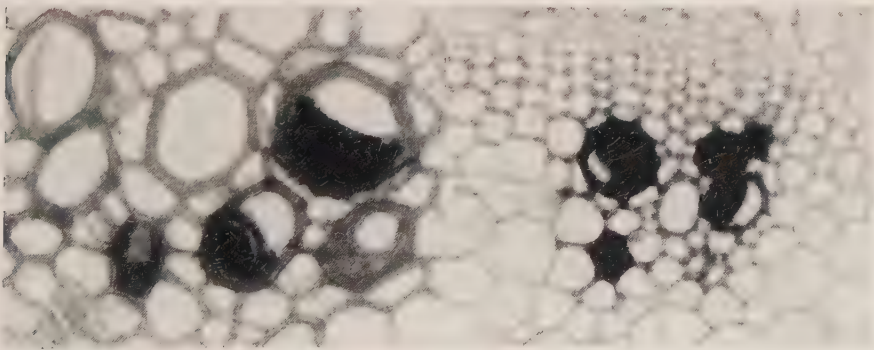


Abb. 3. Verstopfte Gefäße von Testpflanzen, die im Kulturfiltrat standen

Nach diesen Feststellungen konnte man versuchen, das verschiedene Verhalten der Testpflanzen während der Tages- und Nachtzeit zu erklären. In den teilweise verstopften Leitgefäßen war der Wassertransport offenbar behindert worden und konnte daher nicht wie unter normalen Bedingungen ablaufen, so daß am Tage bei geöffneten Spaltöffnungen die Wasserabgabe infolge der Transpiration, die noch durch das relativ warme und trockene Wetter begünstigt wurde, größer war als die eingeschränkte

Wasseraufnahme. Nachts dagegen, wenn die Spaltöffnungen geschlossen waren, reichte das aufgenommene Wasser aus, um die Zellen der Sprosse wieder turgeszent zu machen.

Es konnte dann noch der Beweis erbracht werden, daß die braune Substanz des Kulturfiltrates in ursächlichem Zusammenhange mit dem reversiblen Welken der Testpflanzen gestanden hatte. Auf Grund der Vermutung, daß die braune Substanz, die in den Gefäßen der Sprosse die Verstopfung verursachte, mit dem braunen Farbstoff des Kulturfiltrates identisch sein mußte, wurden folgende Versuche unternommen.

Der Farbstoff des Kulturfiltrates wurde nach zwei Methoden aus der Lösung entfernt. Mit dem farbstofflosen Kulturfiltrat konnten weitere Testversuche angestellt werden.

1. 100 ml Kulturfiltrat wurden mit 100 mg Bariumhydroxyd versetzt, wobei der Farbstoff, wie oben angegeben, ausfiel. Nach dem Absetzen des Niederschlages ist die darüberstehende Flüssigkeit dekantiert und



Abb. 4. Mitte: Kartoffelsproß in farbstoffhaltigem Kulturfiltrat,  
l. u. r.: Sprosse in farbstofffreier Kulturflüssigkeit

filtriert worden. Das Filtrat reagierte nach dieser Behandlung etwas alkalisch. Mit verdünnter Schwefelsäure konnte die ursprüngliche  $\text{cH}^+$  des Kulturfiltrates von einem pH 6,3 bis pH 6,6 wieder eingestellt werden. Das überschüssige Barium ließ sich nach Zugabe von verdünnter Schwefelsäure als schwer lösliches Sulfat ausfällen. Dieser Niederschlag war fein kristallin und ging durch das Filter. Aus diesem Grunde mußte die Flüssigkeit acht bis zehn Stunden stehenbleiben, bis sich der Niederschlag restlos abgesetzt hatte; hernach wurde vorsichtig abdekantiert. Auf diese Weise konnte das Barium weitgehend aus dem Filtrat entfernt werden. Das so vorbehandelte Kulturfiltrat ist dann zum Testen verwendet worden. Zu diesen Testversuchen dienten nun Kartoffelsprosse in farbstoffhaltigem Kulturfiltrat als Kontrolle. Nach drei Tagen Testdauer zeigten die Pflanzen, welche in dem vom Farbstoff befreiten „Barium“-Filtrat standen, keine Welkeerscheinungen (Abb. 4).

2. In einem weiteren ähnlichen Versuch konnte der Farbstoff mit Bleiazetat ausgefällt werden. Hier wurden zu je 100 ml Kulturfiltrat



100 mg Bleiazetat hinzugefügt. Nach der Trennung der Flüssigkeit von dem Niederschlag wurde geprüft, ob noch Blei in der Lösung vorhanden war. Dies geschah dadurch, daß ein kleiner Anteil mit Essigsäure angesäuert und mit Natriumazetat gepuffert wurde. Die auf Zusatz von Kaliumbichromat entstandene schwache Trübung ließ auf nur geringe Mengen Blei schließen. Um während des Testens Fehlerquellen auszuschalten, wurde zu Kontrollzwecken Leitungswasser anteilmäßig mit der gleichen Menge Bleiazetat versetzt und von den gebildeten basischen Bleicarbonatverbindungen vorsichtig dekantiert. Beide Flüssigkeiten wurden sodann zum Testen benutzt, wobei sich ebenfalls nach drei Tagen Testdauer keine Welkesymptome zeigten (Abb. 5).

Die oben beschriebenen Versuche mit farbstoffbefreiten Kulturfiltraten sind zehnmal mit jeweils sechs Parallelen wiederholt worden und hatten immer das gleiche Ergebnis.

Mit einer geringeren Anzahl Wiederholungen sind dann noch folgende Testversuche gemacht worden:



Abb. 5. Links: Kontrollpflanze in Wasser mit Bleiazetat, Mitte: Sproß in farbstoffhaltigem Kulturfiltrat, rechts: Sproß im farbstoffbefreiten „Blei“-Filtrat

Das Kulturfiltrat wurde im Vakuum bei 25 ° C auf  $\frac{2}{3}$  seines Volumens eingedampft und anschließend in der üblichen Weise zum Testen benutzt. Die Pflanzen zeigten tagsüber etwas stärkere Welkesymptome als bei nichteingedampftem Kulturfiltrat, während sich sonst keine wesentlichen Abweichungen vom Welkeeffekt ergaben.

100 ml Kulturfiltrat wurden mit 2 ml 3%iger Wasserstoffsuperoxydlösung versetzt und 1½ Stunden erhitzt. Es trat eine Entfärbung ein, die offenbar auf einer Zerstörung des Farbstoffes beruhte. Testpflanzen, die in einer solchen Lösung standen, zeigten keine Welkeerscheinungen.

Gleiches Erhitzen ohne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> änderte die Wirkung des Kulturfiltrates im Testversuch nicht. Der Stoff, der die Gefäße verstopfte, ist also hitzestabil, wird aber in der Hitze durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> unwirksam.

Das Kulturfiltrat wurde 36 Stunden der Dialyse unterworfen und anschließend wie üblich mit Kartoffelsprossen getestet. Dabei ergaben sich zwei Möglichkeiten:

Zunächst wurde die Kulturlösung verwendet, die mit dem Farbstoff im Schlauch verblieben war. Hier zeigten sich erwartungsgemäß die Erscheinungen, wie sie bei unbehandeltem Kulturfiltrat beschrieben worden sind.

Das Dialysat fand Verwendung, nachdem es im Vakuum auf das ursprüngliche Volumen eingedampft worden war. An den Testpflanzen waren dann im Versuch keine Welkesymptome zu vermerken.

### Zusammenfassung und Besprechung

Es kann bestätigt werden, daß *Rhizoctonia solani* starke Zellulase- und Pektinasewirkungen erzielen kann, also enzymatische Fähigkeiten für einen Angriff auf das Gewebe der Kartoffelstaude hat.

In rhizoctoniakranken Kartoffelkeimen sind die Gefäße mit einer braunen Masse verstopft. Die Nährlösung einer *Rhizoctonia*-Kultur in Czapek-Dox enthält nach acht Wochen einen braunen Farbstoff, der im Testversuch die Gefäße der Kartoffelsprosse verstopft und ein Welken begünstigt, das im Wechsel der Transpirationsschwankungen reversibel ist, d. h. ein Erschlaffen ermöglicht und ein Turgeszentwerden zuläßt. Der verstopfende Stoff kann aus dem Kulturfiltrat entfernt werden, wobei es die welkebegünstigende Wirkung verliert.

Das Kulturfiltrat enthält nichts, was ein Welketoxin sein könnte, denn die Welkeeffekte sind nicht irreversibel und es treten keine typischen Nekrosen auf, die auf Toxine zurückzuführen sind.

Weil das Wipfelrollen und seine Folgesymptome kaum etwas anderes als toxische Effekte sein können, taucht der Zweifel auf, ob sie unbedingte Symptome des Rhizoctoniefalles sind. Es kann auch sein, daß der Wurzeltöterbefall die Symptomausbildung einer Parallelerkrankung prädisponiert.

### Literaturverzeichnis

- BOLLER, A., 1951: Über Lycomarasmin, ein welkeaktives Stoffwechselprodukt aus *Fusarium lycopersici* Sacc. ETH Zürich, Prom. Nr. 2047—1951.
- BRAUN, H., 1930: Der Wurzeltöter der Kartoffel. Berlin.
- DAVIS, D., WAGGONER, P. E. and DIMOND, A. E., 1953: Conjugated phenols in the *Fusarium* wilt syndrome. *Nature* 172, 959—961.
- GÄUMANN, E. und JAAG, O., 1950: Über das toxigene und physikalisch induzierte Welken. *Phytopath. Z.* 16, 226—256.
- HALLMANN, L., 1953: Bakteriologische Nährböden. Stuttgart.
- HOFFERBERT, W. und ORTH, H., 1951: Unsere Arbeiten über *Rhizoctonia*-Fragen bei Kartoffeln. *Z. Pflanzenkrankh.* 58, 245—255.
- HOFFMANN, K. A., 1924: Lehrbuch der anorganischen Chemie. Braunschweig.
- JANKE, A., 1946: Arbeitsmethoden der Mikrobiologie. Leipzig-Dresden.
- MÜLLER, K. O., 1924: Untersuchungen zur Entwicklungsgeschichte und Biologie von *Hypochnus solani* und *Rhizoctonia solani*. *Arb. Biol. Reichsanst. Land- u. Forst-wirtsch.* 13, 197—262.
- RICHTER, H. und SCHNEIDER, R., 1950: Untersuchungen zur *Rhizoctonia*-Anfälligkeit der Kartoffelsorten. *Züchter* 20, 257—267.
- SCALES, F. M., 1916: A new method of precipitating cellulose for cellulose-agar. *Zbl. Bakt.* 2, 44, 661.

*Aus dem Institut für Pflanzenpathologie und Pflanzenschutz  
der Georg-August-Universität Göttingen*

*Direktor: Prof. Dr. W. H. Fuchs*

*und dem Forschungsinstitut der Kleinwanzlebener Saatzucht A. G. Einbeck*

*Leiter: Dr. habil. L. A. Schlösser*

## **Untersuchungen über den Wirtspflanzenbereich des Vergilbungsvirus der Beta-Rüben (*Corium Betae*)**

Von

U. BEISS

### **I. Einleitung**

Über die Geschichte der Mosaik und Vergilbung erzeugenden Rüben-virosen ist zwar nichts genaueres bekannt, doch ist es wahrscheinlich, daß diese Krankheiten schon vor längerer Zeit ihren Weg zu den Kulturrüben gefunden haben. Die außerordentlich gefährliche und immer größere Gebiete erobernde Viruswelle der Vergilbungskrankheit tritt jedoch erst seit etwa 25 Jahren auf. Dabei dürfte ein wichtiger Ausgangsort dieser Virose nach Untersuchungen von SCHLÖSSER (36) in Südost-England liegen.

Auf dem europäischen Kontinent kann eine Ausbreitung dieser Krankheit von Nord-Westen nach Süd-Osten bemerkt werden. Dabei tritt sie in atlantischen Klimagebieten mit milderen Wintern durchweg epidemisch auf, während sie in weiter östlich gelegenen Gebieten mit stärkeren Wintern meist nur mehr oder weniger sporadisch vorkommt.

Dies beruht hauptsächlich auf dem Entwicklungszyklus und Gradationsverlauf der als Vektoren bedeutsamen Aphiden (45). Daneben ist für die epidemische Ausbreitung der Vergilbungskrankheit auch die Frage der Virusüberwinterung von Bedeutung. Als Winterwirte kommen im Herbst infizierte Stecklinge von Futter- und Zuckerrüben sowie Feldbestände von Winterpinat und eingemietete Futterrüben in Frage. Außerdem kann das Virus in anfälligen Wild-Chenopodiaceen die vegetationsarme Zeit überbrücken, wie dies für einige Gebiete Englands und Hollands festgestellt wurde (34, 36).

Hieraus ergibt sich die Frage, ob in den mitteleuropäischen Zuckerrübenanbaugebieten Unkräuter für eine Überwinterung und Verbreitung des Vergilbungsvirus Bedeutung haben können.

<sup>1)</sup> Die vorliegenden Untersuchungen wurden von Dr. habil. L. A. SCHLÖSSER angeregt und in Zusammenarbeit der genannten Institute zu Ende geführt. Für die Überlassung zahlreicher unveröffentlichter Beobachtungen und Ergebnisse danke ich auch an dieser Stelle Herrn Dr. habil. L. A. SCHLÖSSER verbindlichst. Herrn Dr. C. E. BÜCHTING danke ich vielmals für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.



Bis vor kurzem wurden als Wirtspflanzen des Vergilbungsvirus nur einige Chenopodiaceen und Amarantaceen genannt (18, 21, 26). 1952 fand SCHLÖSSER (37), daß auch Arten aus anderen Familien für diese Virose empfänglich sind und wies vor allem darauf hin, daß einige Ackerunkräuter Symptome einer Mischinfektion mit Vergilbungs- und Mosaikvirus zeigten. Aus solchen Pflanzen konnte das Virusgemisch mittels gesunder Läuse auf Zuckerrüben übertragen werden.

Auf Grund dieser Beobachtung und der Vermutung, daß vor allem perennierende Arten für die Epidemiologie der Vergilbungskrankheit grundsätzliche Bedeutung haben können, nahmen wir die Untersuchungen weiterer Ackerunkräuter in Angriff. Wir versuchten dabei der Spezialisierung der Vergilbungsviren Rechnung zu tragen und knüpften an Ergebnisse SCHLÖSSERS (unveröff.) über die Unterschiede der Symptomausprägung von Virusisolaten verschiedener Herkunft an.

In diesem Zusammenhang muß auch die Frage aufgeworfen werden, ob etwa die Virulenz der verwendeten Virusisolate durch Passage über bestimmte, nicht völlig „kongeniale“ Wirte verändert wird. Bei humanpathogenen Viren sind derartige Passageeffekte seit PASTEUR bekannt. Ähnliches wurde auch in letzter Zeit bei pflanzenpathogenen Viren beobachtet (9, 12, 24).

## II. Experimentieller Teil

### A. Material und Methodik

#### 1. Versuchsmaterial

Die Infektionen wurden mit einigen Virusisolaten durchgeführt, die von SCHLÖSSER aus toleranten kranken Wildrüben von der englischen Südküste und aus Zuckerrüben verschiedener europäischer Herkunft gewonnen wurden. Neben einer unterschiedlichen Beeinflussung des Chemismus der Rübe (SCHLÖSSER, unveröff.) verursachen diese Isolate an der als Testpflanzen verwendeten Zuckerrübe auch eine verschiedenartige Ausbildung von Krankheitssymptomen, welche im folgenden kurz charakterisiert sei:

##### „Gelbsucht Friesland“ (= GF)

Neben einer Wachstumshemmung tritt als Primärsymptom 12 bis 16 Tage nach der Infektion eine Adernaufhellung auf. Später entwickelt sich an den ältesten Blättern eine von der Spitze und den Rändern ausgehende Vergilbung. Hierbei bleiben die Hauptadern längere Zeit grün.

##### „Nadelstich“ (= Na)

Unter günstigen Bedingungen geht die primäre Adernaufhellung in eine bräunliche Adernekrose über. Später treten von den mittleren Blättern ab nach außen bräunliche Nekrosen auf. Die eigentlichen „Nadelstich“-Symptome erscheinen an den jüngeren, nachwachsenden Blättern und lassen sich meist bis in die noch nicht vergilbten Außenblattpartien verfolgen. Jedoch treten sie nicht zu jeder Jahreszeit auf; ein Maximum der „Nadelstichbildung“ scheint in den Monaten Oktober bis Januar vorzuliegen. Bei der Vergilbung der Außenblätter fällt im Gegensatz zu GF die netzartige Struktur der länger grün bleibenden Aderung auf.

##### „Dunkle Punkte“ (= DP)

Die Symptome ähneln denen von Na; jedoch fehlen die eigentlichen „Nadelstiche“, dafür treten an den vergilbten Blättern bräunliche, später oft nekrotische Flecke

(= „dunkle Punkte“) im Blattgewebe, besonders an den Blattspitzen auf, die einen Durchmesser bis zu 4 mm aufweisen können.

„Fettflecke“ (= Fe)

Bei dieser Infektion erscheinen an den mittleren Blättern „fettflecken“-ähnliche hellgrüne Aufhellungen des Blattgewebes, neben denen auch oft sogenannte „Ringflecken“ auftreten. Im Gegensatz zum eigentlichen Rübenmosaik sind sie jedoch erst an den mittleren und nie an den jüngeren Blättern der Rosette zu bemerken.

„Mischinfektion“ (= Mi)

Dieses Isolat besteht aus einer mittelstarken Form des Rübenmosaiks, die nicht zur Verkrüppelung der Blätter führt, und einer starken Gelbsuchtkomponente. Schon einige Tage nach der Infektion zeigen die jungen Herzblätter Mosaiksymptome, und je nach Außenbedingungen folgen dann die Vergilbungssymptome nach zwei bis vier Wochen.

Im Verlauf der Infektionsversuche ergab sich die Notwendigkeit, sich entweder in der Zahl der verwendeten Virusisolate oder aber in der Zahl der zu untersuchenden Pflanzenarten zu beschränken. Deshalb wurde bei einem Teil der Versuche nur mit dem Isolate Mi (s. oben) und einem weiteren stark wirksamen Gelbsuchtisolat (= GD) gearbeitet, welches 1953 in Einbeck isoliert wurde. An der Zuckerrübe zeigten sich nach Infektion mit diesem Virus-„Stamm“ die Symptome des Isolates Na (s. oben); jedoch traten dabei wesentlich stärkere Wachstumshemmungen und Nekrosebildungen auf.

Alle genannten Virusisolate hemmten das Wachstum der infizierten Rüben. Die stärkste Wirkung zeigten die Isolate Mi, DP und GD, dann folgten in abnehmender Stärke Fe, GF und Na. Um auch in Wintermonaten, in denen die Ausbildung der Vergilbungssymptome an der Rübe stark verzögert oder gänzlich unterdrückt wird, die erfolgreiche Infektion feststellen zu können, wurde als zusätzliche Testpflanze *Chenopodium capitatum* benutzt. Diese Art zeigte auch unter ungünstigen Wachstumsbedingungen eine nur geringfügig verzögerte Ausbildung der schon beschriebenen Symptome (38). Qualitative Unterschiede zwischen den einzelnen Isolaten wurden auf dieser Pflanze nicht beobachtet, jedoch traten quantitative Unterschiede in der Intensität und Schnelligkeit der Symptomausbildung auf.

Die bei den Versuchen verwendeten Zuckerrüben stammten in allen Fällen aus einer für die Gelbsucht mittelanfälligen Inzuchtlinie (9819) der Zuchtrichtung E. Bei den Unkräutern, deren Samen durchweg von Wildbeständen stammten, wurde nach Möglichkeit mit Inzuchtlinien, die zum Teil durch mehrere Inzuchtgenerationen geführt wurden, gearbeitet. War dies nicht möglich, wurden die Versuche jeweils mit dem Saatgut von nur einer Pflanze durchgeführt.

## 2. Versuchsmethodik

Die Versuche wurden im Gewächshaus durchgeführt, welches im Sommer auf Außentemperatur und im Winter auf  $+20^{\circ}\text{C}$  (kurzfristige Schwankungen  $\pm 5^{\circ}\text{C}$ ) gehalten wurde. In der Hauptflugzeit der Blattläuse wurden die Versuche in läusedichte Isolierkabinen verlegt, in denen die Temperatur  $+22^{\circ}\text{C}$  betrug; jedoch ließen sich auch hier kurzfristige Schwankungen von  $\pm 5^{\circ}\text{C}$  nicht ganz vermeiden.

Zur vektoriellen Übertragung des Virus wurde aus methodischen und praktischen Gründen *Myzodes persicae* benutzt; denn nach den von STEUDEL (44, 45) und von SCHLÖSSER und BECKER (unveröff.) durchgeführten Versuchen treten bei Übertragung mit *Doralis fabae* die Symptome später und schwächer auf als bei der mit *Myzodes persicae*.

Es wurde im 2- bis 4-Blatt-Stadium infiziert. Hierzu wurden Glasröhrchen über die Pflanze gesteckt, die Läuse mit einem Haarpinsel auf die Keimblätter gesetzt, und der obere, offene Teil des Röhrchens wurde mit Watte abgedichtet. Nach 48- bis 72stündiger Saugzeit wurden die Läuse mit einer 0,05%igen Systox-Lösung abgetötet.

Der Infektionserfolg wurde an der Ausprägung der Symptome festgestellt. Um diese Beobachtungen eindeutig zu bestätigen, wurden von mindestens zehn infizierten Unkrautpflanzen Rückinfektionen auf Rübe und *Chenopodium capitatum* durchgeführt. Bei diesen Rückinfektionsversuchen wurden zur Kontrolle des Schadbildes bzw. zur Feststellung etwaiger Veränderungen des Virusisolates durch die Unkrautpassage jeweils einige Pflanzen mit Blattläusen infiziert, die den betreffenden Virus-„Stamm“ von kranken Zuckerrüben aufgenommen hatten. Ferner wurden immer gleichaltrige, nichtinfizierte Rübenpflanzen zum Vergleich mit herangezogen. Auch wurden mechanische Rückinfektionen durch Abreibung vorgenommen. Hierzu wurden die Blätter einiger kranker Pflanzen mit Quarzsand zerrieben. Der dabei gewonnene Preßsaft wurde mit etwas Karborund versetzt und mit einem Wattebausch auf die Ober- und Unterseite eines jeden Blattes junger Rüben im 2- bis 4-Blatt-Stadium gerieben und diese darauf mit Wasser abgespült.

Neben diesen beiden Übertragungswegen besteht noch die Möglichkeit der Übertragung pflanzenpathogener Viren mit Hilfe von *Cuscuta*-Arten. Wie bereits berichtet wurde (15), ist auf diese Art die Übertragung des Vergilbungsvirus (Isolat GD) von Rübe zu Rübe möglich. Bei einem ähnlichen Versuch mit dem Isolat Mi hatte *Cuscuta Gronovii* am 29. Juli 1954 Brücken zwischen kranken und gesunden Rüben gebildet. Bereits vier Wochen später (1. September 1954) wurden die Verbindungen gelöst. Nach zweieinhalb Wochen (17. September 1954) waren von den 27 ursprünglich gesunden Rüben 21 an der Gelbsucht erkrankt; jedoch konnte in keinem Falle eine Übertragung der Mosaikkomponente des Isolates Mi erzielt werden.

Da die verwendeten Virusisolate die stoffliche Zusammensetzung der Rübe in unterschiedlicher Weise beeinflussen (SCHLÖSSER, unveröff.), wurde versucht, weitere Hinweise auf diese unterschiedliche Wirkung an Nicht-Chenopodiaceen zu gewinnen. Hierzu wurde das Frischgewicht, nach 24stündiger Trocknung bei 110° C die Trockensubstanz und aus der Differenz der Wassergehalt der Einzelpflanzen ermittelt. Mit dem Trockenmaterial von *Capsella bursa pastoris* wurden außerdem die folgenden Bestimmungen durchgeführt:

Aschegehalt: 0,5 bis 1,0 g Trockensubstanz wurden 30 Minuten bei 800° C geglüht. Der nicht verglühte Rückstand wurde als Asche bezeichnet.

Löslicher Stickstoff und Proteinstickstoff: 250 mg Trockensubstanz wurden mit 25 ccm dest. Wasser 5 Minuten im kochenden Wasserbad erwärmt. Nach Abkühlung wurden 30 ccm 10%ige Trichloressigsäure zugegeben; die Probe wurde über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Danach wurde filtriert und der Rückstand dreimal mit je 5 ccm 10%iger Trichloressigsäure nachgewaschen. Der Aufschluß geschah nach WIENINGER, und die Stickstoffbestimmung wurde nach KJELDAHL, Modifikation PARNAS-WAGNER (31), ausgeführt. Die Summe von lösl. N und Protein-N wurde als Gesamt-N bezeichnet. Die statistische Bearbeitung wurde nach dem Summenverfahren durchgeführt (52, 30).

## B. Infektionsversuche

Wie bereits berichtet wurde (38), verliefen die Infektionsversuche bei 14 verschiedenen Pflanzenarten ohne sichtbaren Erfolg. Dagegen konnten sieben Arten erfolgreich mit dem Vergilbungsvirus (s. Tabelle 1) und fünf Arten mit dem Rübenmosaik infiziert werden; Rückinfektionen auf Rübe bestätigten die erfolgreiche Infektion (s. Tabelle 2 und 3). Die Versuche, das Vergilbungs- und Mosaikvirus durch Samen erkrankter Mutterpflanzen zu übertragen, zeigten bei diesen Arten jedoch keinen sichtbaren Erfolg.



Tabelle 1

Zusammengefaßte Darstellung der Infektionsversuche  
zur Ermittlung des Wirtspflanzenbereiches  
des Vergilbungsvirus<sup>1)</sup>

Infektion von:	mit:	Vergilbungsvirus		Mischinfektion	
		Pflanzenzahl	% erkrankt	Pflanzenzahl	% erkrankt
<i>Capsella bursa pastoris</i> .....		498	63	328	88
<i>Thlaspi arvense</i> .....		417	57	244	79
<i>Polygonum convolvulus</i> .....		23	61	25	52
<i>Papaver rhoeas</i> .....		96	46	68	54
<i>Atriplex nitens</i> .....		40	80	40	85
<i>Chenopodium ficifolium</i> .....		53	77	50	92
<i>Senecio vulgaris</i> .....		48	69	50	74

<sup>1)</sup> Die Einzelunterlagen sind im Institut für Pflanzenpathologie und Pflanzenschutz der Universität Göttingen hinterlegt.

Tabelle 2

Vektorielle Rückinfektionen  
von vergilbungs-kranken  
Unkräutern auf Rübe

Rückinfektion von:	Pflanz- zahl	% erkrankt
<i>Capsella bursa pastoris</i>	389	27
<i>Thlaspi arvense</i> .....	575	30
<i>Polygonum convolvulus</i>	78	50
<i>Papaver rhoeas</i> .....	136	30
<i>Atriplex nitens</i> .....	117	77
<i>Chenopodium ficifolium</i>	96	91
<i>Senecio vulgaris</i> .....	281	45

Tabelle 3

Mechanische Rückinfektionen  
der Mosaikkomponente des  
Isolates Mi von infizierten  
Unkräutern auf Rübe

Rückinfektion von:	Pflanz- zahl	% erkrankt
<i>Capsella bursa pastoris</i>	108	88
<i>Papaver rhoeas</i> .....	88	56
<i>Chenopodium ficifolium</i>	186	30
<i>Senecio vulgaris</i> .....	109	44
<i>Trifolium incarnatum</i> .	86	45

Über die bei den anfälligen Arten auftretenden Krankheitssymptome wurde bereits berichtet (38); zusätzlich kann dazu noch folgendes gesagt werden:

*Capsella bursa pastoris*: Nach Infektion mit den Isolaten GF, Na und DP zeigten sich die bereits beschriebenen Krankheitssymptome. Abweichend von der im späteren Krankheitsstadium auftretenden Rot- bzw. Rotbraunfärbung der älteren Blätter erfolgte bei Befall mit dem Isolat Fe jedoch eine Vergilbung (ohne erhöhte Turgescenz) dieser Blätter, die daraufhin bald abstarben. Bei Infektion mit dem Isolat Mi erschienen die Symptome des Vergilbungsvirus; zusätzlich trat jedoch an allen grünen Pflanzenteilen oft eine grün-grün gelbe Mosaiktüpfelung auf.

Neben diesen Blattsymptomen zeigten alle erkrankten Pflanzen deutliche Wachstumshemmungen; am stärksten traten sie nach Infektion mit Mi auf, in abnehmender Stärke folgten dann die mit den Isolaten Fe, Na, GF und DP. Weiterhin zeigten sich bei allen Infektionsversuchen häufig starke Verkrümmungen und Ausbeulungen der Blätter sowie Rollen der Blattränder nach außen. Auch war die Blattform infizierter Pflanzen häufig rundlicher und weniger stark buchtig ausgeschnitten als bei gesunden Pflanzen.

Bei Rückinfektion auf Rübe (s. Tabelle 2) zeigte es sich, daß auf dieser die Symptome erst spät (nach 53 bis 69 Tagen) und abgeschwächt auftraten; auch ließ das als weitere Testpflanze verwendete *Chenopodium capitatum* keinerlei Anzeichen einer erfolgreichen Infektion erkennen. Dies deutet darauf hin, daß durch die *Capsella*-Passage eine Veränderung des Virus erfolgt (vgl. S. 91).

*Thlaspi arvense*: Diese Art zeigte nach Infektion mit verschiedenen Isolaten deutliche Symptome (38), die sich jedoch nur in quantitativer Hinsicht unterschieden. Am stärksten schädigte hierbei das Isolat GF, dann folgten in abnehmender Stärke die „Stämme“ Mi, Na, DP und Fe. Die Rückinfektionen auf Rübe bestätigten die erfolgreiche Infektion von *Thlaspi arvense* mit dem Vergilbungsvirus; das Mosaikvirus konnte jedoch in keinem Falle rückübertragen werden. Ähnlich wie bei *Capsella* erschienen bei der Rückinfektion des Vergilbungsvirus von *Thlaspi arvense* die Blattsymptome erst spät (45 bis 60 Tage nach der Infektion) und abgeschwächt; ebenso zeigte *Chenopodium capitatum* bei der Rückinfektion keinerlei Anzeichen einer Virusinfektion. Auch hier scheint deshalb eine Veränderung des Virus durch die Passage zu erfolgen (vgl. S. 91).

*Polygonum convolvulus*: Nach Infektion mit den Isolaten GD und Mi zeigten sich keine Unterschiede in der schon beschriebenen Symptomausprägung (38). Die Rückinfektionen auf *Chenopodium capitatum* und Rübe verliefen erfolgreich; eine Veränderung des Virus durch Passage konnte dabei nicht bemerkt werden. Die Rückübertragung des Mosaikvirus gelang nicht.

*Papaver rhoeas*: Die beiden verwendeten Virus-„Stämme“ GD und Mi riefen an dieser Art qualitativ gleiche Symptome hervor; das Wachstum wurde durch das Isolat Mi allerdings wesentlich stärker gehemmt, so daß einzelne Pflanzen völlig verzwergt blieben und bald nach der Infektion abstarben. Die Rückinfektionen auf Rübe und *Chenopodium capitatum* verliefen erfolgreich, und die dabei auftretenden Symptome entsprachen denen der Symptomkontrollen. Die mechanischen Übertragungsversuche erbrachten dabei die Mosaikanfälligkeit von *Papaver rhoeas*.

*Atriplex nitens*: Nach Infektion mit den Isolaten GD und Mi zeigte diese Art die gleiche Symptomausbildung (38). Während die Rückübertragung des Vergilbungsvirus auf Rübe und *Chenopodium capitatum* in allen Fällen gelang, konnte die Mosaikkomponente in keinem Fall wieder erhalten werden.

*Chenopodium ficifolium*: Die beiden verwendeten Virus-„Stämme“ GD und Mi riefen an dieser Art gleichartige Symptome hervor (38). Jedoch schien das Isolat Mi die Pflanzen stärker zu schädigen, da der Blütenansatz besonders stark herabgesetzt war und die Blüten oft vorzeitig abstarben. Rückinfektionen auf Rübe und *Chenopodium capitatum* waren erfolgreich; die Symptome entsprachen denen der Symptomkontrolle. Die mechanische Rückübertragung der Mosaikkomponente auf die Rübe bestätigte die Mosaikanfälligkeit von *Chenopodium ficifolium*.

Tabelle 4

Intensität der Blattsymptome (B) und Wachstumshemmungen (W)  
im Verlauf des Jahres

Art:	Frühjahr — Herbst		Herbst — Frühjahr	
	W	B	W	B
<i>Capsella bursa pastoris</i> .....	+	+	+++	+++
<i>Thlaspi arvense</i> .....	+++	+++	++	++
<i>Papaver rhoeas</i> .....	+++	+++	—	+
<i>Senecio vulgaris</i> .....	(+)	++	—	(+)
<i>Polygonum convolvulus</i> .....	(+)	++	++	—
<i>Atriplex nitens</i> .....	—	+++	+++	—
<i>Chenopodium ficifolium</i> .....	—	+++	+++	—
Rübe 9819 .....	+++	+++	+	(+)

*Senecio vulgaris*: Neben den Vergilbungssymptomen (38), wie sie nach Befall mit dem Isolat GD auftraten, verursachte die Infektion mit dem Virus-„Stamm“ Mi eine manchmal nur undeutlich erkennbare hell-dunkelgrüne Mosaikfleckung an allen grünen Teilen dieser Art. Wuchshemmungen konnten erst sehr spät beobachtet werden; sie traten am stärksten bei den mit Mi infizierten Pflanzen auf.

Das Gelingen der Infektion wurde durch erfolgreiche Rückinfektionen auf Rübe und *Chenopodium capitatum* bestätigt; die vektorielle und mechanische Rückübertragung der Mosaikkomponente aus den mit Mi infizierten *Senecio*-Pflanzen auf Rübe bewies die Mosaikanfälligkeit dieser Art.

Bei Wiederholungen der Infektionsversuche ergab es sich, daß im Verlauf des Jahres die Blattsymptome und Wachstumshemmungen in verschiedenen Intensitätsstufen auftraten (s. Tabelle 4).

Die Arten, die außerhalb der Hauptvegetationszeit nur schlecht wuchsen (*Polygonum*, *Atriplex*, *Chenopodium*), zeigten einheitlich die stärksten Blattsymptome während des Sommerhalbjahres; im Winterhalbjahr dagegen prägten sich die Wachstumshemmungen am deutlichsten aus und führten oft zu einem baldigen Absterben der Pflanzen.

Kein übereinstimmendes Reaktionsbild ließ sich bei den Arten, die während des ganzen Jahres unter Gewächshausbedingungen gut wuchsen (*Capsella*, *Thlaspi*, *Papaver*, *Senecio*), feststellen; sie zeigten zeitlich verschiedene Maxima der Symptomausprägung.

#### C. Versuche zur Feststellung der unterschiedlichen Einwirkung verschiedener Virusisolate auf Nicht-Chenopodiaceen

Die von SCHLÖSSER isolierten Virusisolate zeigten neben einer verschiedenartigen Symptomausprägung auch eine unterschiedliche Beeinflussung des Chemismus der Rübe (SCHLÖSSER, unveröff.). Zur weiteren Charakterisierung dieser Isolate wurden deshalb Ertragsversuche an einigen nicht zur Familie der Chenopodiaceen gehörigen Arten angestellt.

**Samenertrag:** Am 8. September 1953 wurde eine Gruppe von *Capsella bursa pastoris* mit den Isolaten Mi, Na, GF, Fe und DP infiziert.



Tabelle 5

Samenertrag und 100-Korn-Gewicht gesunder und viruskranker Pflanzen

Virusisolat	Samenertrag		100-Korn-Gewicht ( $\phi$ aus 50 Proben) mg
	Anzahl der Pflanzen	Ertrag/Pflz. g	
<i>Capsella bursa pastoris:</i>			
Kontrolle	40	0,362 $\pm$ 0,014	10,2 $\pm$ 0,1
Mi	40	0,131 $\pm$ 0,014	7,7 $\pm$ 0,1
Na	40	0,224 $\pm$ 0,018	9,9 $\pm$ 0,1
GF	40	0,098 $\pm$ 0,015	8,3 $\pm$ 0,1
Fe	40	0,133 $\pm$ 0,013	7,4 $\pm$ 0,1
DP	40	0,193 $\pm$ 0,014	9,9 $\pm$ 0,1
<i>Thlaspi arvense:</i>			
Kontrolle	150	0,281 $\pm$ 0,008	100,6 $\pm$ 0,4
Mi	130	0,189 $\pm$ 0,009	80,8 $\pm$ 0,5
Na	90	0,189 $\pm$ 0,008	83,8 $\pm$ 0,5
GF	70	0,187 $\pm$ 0,009	78,9 $\pm$ 0,4
Fe	115	0,194 $\pm$ 0,007	90,0 $\pm$ 0,3
DP	95	0,195 $\pm$ 0,015	85,8 $\pm$ 0,3

Die Samen konnten im Juni 1953 pflanzenweise geerntet werden. Gleichzeitig wurde das 100-Korngewicht der einzelnen Samenproben bestimmt. Die Virusinfektion hatte in allen Fällen den Samenertrag und das 100-Korngewicht herabgesetzt (s. Tabelle 5). Ein gleichartiger Versuch wurde mit *Thlaspi arvense* durchgeführt; dabei wurden die Pflanzen am 6. Juni 1954 infiziert und der Samen im August 1953 geerntet. Auch hier ergab sich eine eindeutige Schädigung der erkrankten Pflanzen (s. Tabelle 5); im Gegensatz zu dem *Capsella*-Versuch zeigten sich innerhalb der einzelnen Infektionen jedoch keine signifikanten Unterschiede im Samenertrag.

**Ertragsversuche:** Obwohl es sich bei zahlreichen Rückinfektionsversuchen gezeigt hatte, daß von infizierten *Plantago major*-Pflanzen kein Virus wiedererhalten wurde, ließen unterschiedliche Wuchshemmungen infizierter Pflanzen eine Einwirkung des Virus vermuten. Aus diesem Grunde wurde von infizierten *Plantago*-Pflanzen das Frischgewicht, die Trockensubstanz und der Wassergehalt bestimmt. Gleichartige Versuche wurden auch mit *Capsella bursa pastoris* durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Bestimmungen sind in Tabelle 6 zusammengefaßt.

Von dem zweiten *Capsella*-Versuch wurden ferner je 200 Pflanzen in Gruppen von je 10 zusammengefaßt. An aliquoten Teilen der Trockensubstanz wurde der Gehalt an Asche, Protein-N und löslichem N bestimmt. Die in Tabelle 7 angegebenen Werte sind jeweils Mittelwerte von je 20 Proben zu je zehn Pflanzen.

#### D. Die Wirkung der Unkrautpassage auf das Virus

Bei der Rückinfektion von viruskranken Unkräutern auf Rübe traten in einigen Fällen andersartige Symptome auf als die, die den ursprünglichen

Tabelle 6  
Ergebnisse der Ertragsversuche

Virusisolat	Frischgewicht g	Trockengewicht g	Wassergehalt % F
<i>Plantago major</i> , infiziert am 18. Mai 1953, Ernte am 24. Juni 1953 ( $\Phi$ aus 40 Einzelpflanzen, bei Mi aus 60 Pflanzen)			
Kontrolle	15,24 $\pm$ 0,80	1,47 $\pm$ 0,08	89,9 $\pm$ 0,2
Mi	7,30 $\pm$ 0,36	0,74 $\pm$ 0,05	89,2 $\pm$ 0,3
Na	9,25 $\pm$ 0,43	0,80 $\pm$ 0,06	90,3 $\pm$ 0,2
GF	9,53 $\pm$ 0,59	0,91 $\pm$ 0,06	89,1 $\pm$ 0,3
Fe	9,53 $\pm$ 0,58	1,05 $\pm$ 0,07	88,5 $\pm$ 0,5
DP	13,13 $\pm$ 0,59	1,17 $\pm$ 0,06	90,0 $\pm$ 0,2
<i>Capsella bursa pastoris</i> , infiziert am 4. Mai 1953, Ernte am 22. Mai 1953 ( $\Phi$ aus 20 $\times$ 2 Pflanzen)			
Kontrolle	4,65 $\pm$ 0,02	0,578 $\pm$ 0,021	88,0 $\pm$ 0,3
Mi	2,69 $\pm$ 0,15	0,302 $\pm$ 0,015	88,7 $\pm$ 0,3
Na	2,67 $\pm$ 0,14	0,290 $\pm$ 0,013	89,7 $\pm$ 0,4
GF	3,11 $\pm$ 0,17	0,428 $\pm$ 0,018	86,2 $\pm$ 0,3
Fe	3,00 $\pm$ 1,22	0,332 $\pm$ 0,013	89,2 $\pm$ 0,3
DP	4,20 $\pm$ 0,14	0,459 $\pm$ 0,017	88,9 $\pm$ 0,5
<i>Capsella bursa pastoris</i> , infiziert am 7. Juli 1953, Ernte am 30. Juli 1953 ( $\Phi$ aus 200 Einzelpflanzen)			
Kontrolle	2,97 $\pm$ 0,08	0,253 $\pm$ 0,008	90,7 $\pm$ 0,1
Mi	1,90 $\pm$ 0,05	0,150 $\pm$ 0,004	93,7 $\pm$ 0,1
Na	1,80 $\pm$ 0,04	0,146 $\pm$ 0,004	92,4 $\pm$ 0,1
GF	1,40 $\pm$ 0,04	0,167 $\pm$ 0,004	88,6 $\pm$ 0,1
Fe	2,00 $\pm$ 0,06	0,161 $\pm$ 0,005	90,5 $\pm$ 0,1
DP	1,82 $\pm$ 0,04	0,178 $\pm$ 0,004	92,3 $\pm$ 0,1

Tabelle 7  
Ergebnisse der Asche- und N-Bestimmungen bei  
*Capsella bursa pastoris*  
(Ergebnisse in % der Trockensubstanz)

Virusisolat	Aschegehalt % T	Protein-N % T	Lösl. N % T	Ges.-N % T	Protein-N : lösl. N
Kontrolle	18,3 $\pm$ 0,3	2,95 $\pm$ 0,05	1,51 $\pm$ 0,05	4,47 $\pm$ 0,07	1,96
Mi	15,7 $\pm$ 0,2	3,16 $\pm$ 0,06	1,70 $\pm$ 0,04	4,86 $\pm$ 0,07	1,86
Na	17,0 $\pm$ 0,3	3,40 $\pm$ 0,05	1,56 $\pm$ 0,03	4,96 $\pm$ 0,06	2,18
GF	16,9 $\pm$ 0,2	3,22 $\pm$ 0,04	1,54 $\pm$ 0,04	4,76 $\pm$ 0,05	2,09
Fe	18,0 $\pm$ 0,2	3,08 $\pm$ 0,06	1,38 $\pm$ 0,06	4,51 $\pm$ 0,09	2,23
DP	17,3 $\pm$ 0,3	3,05 $\pm$ 0,05	1,37 $\pm$ 0,04	4,41 $\pm$ 0,09	2,23

Virusisolaten eigen waren. Weitere Infektionsversuche und Rückinfektionsversuche bestätigten, daß solche Veränderungen nur nach Passage über *Capsella bursa pastoris* und *Thlaspi arvense* auftraten (s. Tabelle 8).

Das ursprüngliche Virusisolat GD wurde vom Frühjahr bis Herbst 1954 in fünf sukzessiven Passagen von Rübe zu Rübe übertragen und verursachte eine weitgehende konstante Symptomausprägung; als Primärsymptome traten dabei zehn bis zwölf Tage nach der Infektion Adernaufhellungen und unter günstigen Außenbedingungen Nekrosen auf. Insgesamt wurden dabei 434 Rüben infiziert, von denen 76 % sichtbar erkrankten.

Tabelle 8

Passage des Virusisolates GD über verschiedene Pflanzen

Passage über	Infektion der Rübe	Blatt- symptome n. Tagen	Auswertung		
			am	Pflanzen- zahl	% erkrankt
Rübe .....	12. 4. 54	12	28. 5. 54	45	40
<i>Papaver rhoeas</i> .....	12. 4. 54	12	28. 5. 54	39	39
Rübe .....	24. 4. 54	11	4. 6. 54	58	90
<i>Atriplex nitens</i> .....	24. 4. 54	11	4. 6. 54	47	87
Rübe .....	25. 5. 54	16	25. 6. 54	54	67
<i>Senecio vulgaris</i> .....	25. 5. 54	16	25. 6. 54	76	46
Rübe .....	28. 5. 54	12	27. 7. 54	72	97
<i>Thlaspi arvense</i> .....	28. 5. 54	44	27. 7. 54	91	68
Rübe .....	3. 6. 54	14	11. 7. 54	32	81
<i>Polygonum convolvulus</i> .....	3. 6. 54	14	11. 7. 54	16	31
<i>Chenopodium capitatum</i> .....	3. 6. 54	14	11. 7. 54	39	80
Rübe .....	19. 6. 54	10	13. 9. 54	85	91
<i>Chenopodium ficifolium</i> .....	19. 6. 54	10	13. 9. 54	40	87
<i>Capsella bursa pastoris</i> .....	19. 6. 54	56	13. 9. 54	80	28

Nach Passage über *Capsella bursa pastoris* und *Thlaspi arvense* rief dieses Isolat, wie auch bei anderen früheren Versuchen, auf dem sonst stark reagierenden *Chenopodium capitatum* keine Symptome hervor. Auch die Rückinfektion auf Rübe ergab nur eine schwache Symptomausprägung. Im Gegensatz zum Ausgangsisolat GD wurden keine Adernaufhellungen, Nekrosen und „Nadelstiche“ beobachtet. Als erste Krankheitserscheinungen begannen die ältesten Blätter nach 40 bis 60 Tagen von der Spitze her diffus zu vergilben; dabei blieben nur die Hauptadern längere Zeit grün. Die Verdickung der Blätter und deren starres Aussehen hob sich weniger deutlich von den Blättern gesunder Rüben ab als bei Infektion mit dem Isolat GD; jedoch waren auch sie spröde und zerbrachen mit einem knackenden Geräusch. Eine Wachstumshemmung gegenüber der Kontrolle war kaum zu bemerken; in einigen Fällen hatte es eher den Anschein, als ob die infizierten Pflanzen üppiger wuchsen als die Kontrollpflanzen. Besonders die äußeren Blätter waren oft größer und abgerundeter als die entsprechenden Kontrollblätter.

Aus diesen Unterschieden zwischen der Syptomausbildung auf der Rübe und dem Verhalten von *Chenopodium capitatum* schließen wir auf eine Veränderung oder Abschwächung des Virus durch die Passage. Diese Unterschiede traten bei allen Rückinfektionen von *Capsella bursa pastoris* und *Thlaspi arvense* auf Rübe auf, gleichgültig, ob die Unkrautpflanze mehr oder weniger durch die Infektion geschädigt war. Bei der Rückinfektion wurde ausschließlich ein abgeschwächter Virus-„Stamm“ übertragen.

Ein solches am 30. März 1954 von *Thlaspi arvense* rückgewonnenes, im folgenden als GN bezeichnetes Virusisolat wurde im Jahre 1954 sukzessiv viermal von Rübe zu Rübe übertragen; insgesamt wurden dabei 331 Rüben infiziert, von denen 57 % erkrankten. Die Symptome erschienen dabei nach 40 bis 45 Tagen und glichen konstant den oben beschriebenen.



Im Herbst 1954 wurden die Virus-„Stämme“ GD und GN noch einmal auf verschiedene Unkrautpflanzen übertragen. Bei diesem Versuch war die Ausbildung der Blattsymptome deutlich geringer als bei den vorhergehenden Versuchen. *Senecio vulgaris* zeigte nach Infektion mit beiden Isolaten nur eine leichte Gelbfleckung und Rotfärbung an den Rändern der unteren Blätter, die erst 30 Tage nach der Infektion auftrat; Wachstumsunterschiede fehlten.

Auf *Capsella bursa pastoris* rief das Isolat GD keine Wachstumshemmungen hervor, ebenso fehlten die typischen Blattsymptome mit Ausnahme einer schwachen diffusen Aufhellung und geringer Rotfärbung der Blätter. Nach Infektion mit GN war das Wachstum der Pflanzen bereits nach zehn Tagen deutlich gehemmt, nach zwei weiteren Tagen setzte eine unregelmäßige Gelbfleckung der Außenblätter ein. Auf *Papaver rhoeas* ließen sich überhaupt keine Symptome nach der Infektion feststellen. Bei *Thlaspi arvense* rief das Isolat GD bereits nach zehn Tagen starke Wachstumshemmungen hervor; die darauf folgenden Blattsymptome glichen denen durch das Isolat GF verursachten. Nach Infektion mit GN war das Wachstum der infizierten Pflanzen erst sechs Wochen später deutlich gehemmt; als Blattsymptome traten Vergilbungen der älteren Blätter auf, ohne die für die anderen Virusisolate typischen Nekrosen. *Chenopodium capitatum* starb nach Infektion mit GD bereits nach 16 Tagen ab; mit GN infizierte Pflanzen zeigten dagegen keinerlei Symptome.

Von diesen Pflanzen wurden im Herbst 1954 Rückinfektionen auf Rübe durchgeführt. Dabei zeigte es sich, daß eine Abschwächung des Isolates GD nur bei Passage über *Capsella bursa pastoris* und *Thlaspi arvense* eintrat; Rückinfektionen von diesen beiden Arten ergaben auf der Rübe wieder die Symptome des schwachen Stammes GN.

Die Rückinfektion des Isolates GN auf die Rübe zeigte, daß dieses — unabhängig von der als Passagewirt verwendeten Pflanzenart — unverändert zurückerhalten wird; nur aus den symptomlosen Pflanzen von *Chenopodium capitatum* ließ es sich nicht mehr rückgewinnen. Vermutlich kann diese Art ihm nicht mehr als Wirt dienen.

### III. Besprechung der Ergebnisse

Durch unsere Versuche wurden einige neue Erkenntnisse über die Übertragung, den Wirtspflanzenbereich und die Spezialisierung der Vergilbungsviren gewonnen. Vor allem konnte gezeigt werden, daß durch die Passage über zwei der neugefundenen Wirtspflanzen das Virus eindeutig verändert wird. Die nähere Besprechung dieser Ergebnisse sei unter vier Gesichtspunkten zusammengefaßt, wobei wir uns in der Erörterung auf die Verhältnisse bei den Viren der Vergilbungs- und Mosaikkrankheit der Rüben beschränken.

#### 1. Weg und Wirkung des Vergilbungsvirus

Pflanzenpathogene Viren können auf verschiedenen Wegen übertragen werden, von denen je nach den bestimmten Eigenschaften der betreffenden

Viren bestimmte bevorzugt, andere aber kaum oder gar nicht realisiert werden.

Eine mechanische Übertragung der Vergilbungskrankheit wurde früher nicht für möglich gehalten (18); später zeigten jedoch KASSANIS (25) und andere Autoren (45), daß eine solche Übertragung bedingt möglich ist. Uns gelang in keinem Fall die Übertragung des Vergilbungsvirus mit dem Preßsaft erkrankter Unkräuter auf Rüben. Dagegen konnte auf diesem Wege das Mosaikvirus, das auch von Rübe zu Rübe durch Preßsaft übertragbar ist, von einigen der geprüften Unkräuter auf Rübe rückübertragen werden. Erfolglos blieben diese Versuche bei *Thlaspi arvense*, *Polygonum convolvulus* und *Atriplex nitens*; vermutlich sind diese Arten als Wirtspflanzen des Mosaikvirus nicht geeignet.

Eine Übertragung des Virus durch das Saatgut erkrankter Pflanzen ist bisher nur bei wenigen Viren nachgewiesen (26). Alle Untersuchungen über die Vergilbungskrankheit haben gezeigt (17, 18, 45), daß das Virus auf diesem Wege nicht übertragbar ist. Zwar berichteten CLINCH und LOUGHNANE (13), daß eine nicht näher definierte Vergilbungs-„Virose“ durch den Samen erkrankter Rüben übertragen wird. Es ist jedoch ungeklärt, ob dieser abweisende Befund auf besonderen Eigenschaften der verwendeten Rübenfamilie beruht oder aber darauf, daß es sich hier um eine spezielle Virus-„Art“ oder -„Rasse“ handelt.

Da aber grundsätzlich die Möglichkeit offenbleibt, daß die Unterschiede im anatomischen und histologischen Aufbau der Samen sowie bei den physiologischen Vorgängen der Samenreife die Samenübertragbarkeit bei verschiedenen Pflanzen unterschiedlich beeinflussen, wurden die neuen Wirtsarten auf diese Möglichkeit hin untersucht. Trotz längerer Beobachtungszeit konnte jedoch in keinem Falle eine Virusübertragung durch den Samen festgestellt werden.

Aus methodischen Gründen wurde weiterhin untersucht, ob eine Übertragung der beiden Viren mit Hilfe von *Cuscuta*-Brücken möglich ist. In zahlreichen anderen Fällen ist dies bereits erfolgreich durchgeführt (6, 26), wobei des öfteren methodische Schwierigkeiten, die andere Übertragungswege belasteten, ausgeschaltet wurden.

Wie bereits vorläufig mitgeteilt wurde (15), gelang die Übertragung der Vergilbungskrankheit mit Hilfe von *Cuscuta Gronovii*. In weiteren Versuchen, welche die ersten Ergebnisse bestätigten, wurde festgestellt, daß das Rübenmosaik durch *Cuscuta Gronovii* nicht übertragen wird, also die Anwendung einer *Cuscuta*-Brücke eine Möglichkeit zur Trennung einer Gelbsucht-Mosaik-Mischinfektion bietet.

Das unterschiedliche Verhalten beider Viren kann in ihrer verschiedenen Lokalisation in der Pflanze begründet sein. Anatomische Untersuchungen infizierter Rübenpflanzen ergaben, daß beim Rübenmosaik die stärksten Schädigungen im Assimilationsparenchym zu finden sind (14), bei der Vergilbungskrankheit jedoch in den Phloemelementen (32). Nach Bestrahlung virusinfizierter Rüben mit UV-Licht konnten BAWDEN, HAMLYN und WATSON (4) zwar das Vergilbungsvirus unverändert auf andere Pflanzen übertragen,

der Infektionserfolg in gleichartigen Versuchen mit dem Rübenmosaik war dagegen deutlich herabgesetzt. Um maximale Übertragungsfähigkeit durch Vektoren zu erzielen, müssen diese bei den zur Diskussion stehenden Viren unterschiedlich lange Zeiten an der erkrankten Pflanze saugen. Während beim Rübenmosaik nur eine sehr kurze Saugzeit — möglichst mit vorhergehender Fastenperiode — nötig ist, steigert sich bei der Vergilbungskrankheit die Übertragungsfähigkeit der Vektoren mit zunehmender Aufenthaltsdauer an den erkrankten Pflanzen (46, 50). Da nach allen bisherigen Erfahrungen grundsätzliche Unterschiede in den Beladungszeiten zwischen parenchym- und phloemlokalisierten Viren bestehen (1, 43), dürften wohl auch die genannten Differenzen als Beweis für verschiedene Lokalisation der Viren herangezogen werden.

Alle diese Beobachtungen deuten darauf hin, daß das Mosaikvirus seinen Sitz vorwiegend im Assimilationsparenchym hat, das Vergilbungsvirus aber hauptsächlich in den Leitungsbahnen lokalisiert ist. Nach Untersuchungen von BENNETT (6), welche wir bestätigen können, dringen die Haustorien von *Cuscuta*-Arten in die Phloemelemente ein und entnehmen diesen die Nährstoffe. Ein unmittelbarer Stoffaustausch mit dem Parenchym ist dagegen unwahrscheinlich. Die unterschiedliche Übertragung des Vergilbungs- und Mosaikvirus durch *Cuscuta Gronovii* kann also durchaus auf der verschiedenen Lokalisation der Viren in der Wirtspflanze beruhen.

Der natürliche und in unseren Versuchen angewandte Übertragungsweg der beiden Viren ist die Übertragung durch Blattläuse. Aus methodischen Gründen verwendeten wir ausschließlich *Myzodes persicae*, obwohl auch andere Blattläusarten in Frage kommen. Wir konnten dabei keine klaren Beziehungen zwischen dem Infektionserfolg und der zur Übertragung verwendeten Vektorenzahl finden und so die Angaben anderer Autoren bestätigen (18, 41). Eine Erklärung ist hierfür zur Zeit nicht möglich, denn bei der Übertragung eines Virus durch einen Vektor spielen viele Faktoren (Inaktivierungsprozesse, individuelle oder umweltbedingte Unterschiede in der Aufnahme und Abgabe des Virus u. a.) eine Rolle, über die bisher fast gar nichts bekannt geworden ist.

Bei der Betrachtung des Infektionserfolges bei den verschiedenen Wirtspflanzen (vgl. Tabelle 1) ergab es sich, daß allgemein durch die Infektion mit dem Isolat Mi ein höherer Prozentsatz erkrankter Pflanzen erhalten wurde. Auffallend ist, daß dies auch bei Arten der Fall ist, die vom Mosaikvirus nicht befallen werden. Daher kann dies nicht nur mit einer Virulenzsteigerung des Komplexes durch gleichzeitige Einwirkung beider Viren erklärt werden, sondern wird auch vermutlich auf einer höheren Aktivität der Gelbsuchtkomponente des Isolates Mi oder ihrer höheren Konzentration in diesen Wirten beruhen.

Die mit *Atriplex nitens* und *Chenopodium ficifolium* durchgeführten Infektions- und Rückinfektionsversuche wiesen im allgemeinen einen besseren Infektionserfolg auf als gleichartige Versuche mit Nicht-Chenopodiaceen. Dies mag darin begründet sein, daß Chenopodiaceen als „kongeniale“ Wirte



dem Vergilbungsvirus eine bessere Aufenthalts- und Vermehrungsmöglichkeit bieten; hierauf weist auch die bei diesen Arten deutlichere und einheitlichere Symptomausbildung hin.

Die Unterscheidung gesunder und kranker Pflanzen war bei infizierten Nicht-Chenopodiaceen oft schwierig, da die Symptome zu den verschiedenen Jahreszeiten nicht immer eindeutig zu erkennen waren. Vereinzelt wurden auch symptomlose Pflanzen gefunden, welche erst nach Rückinfektion auf Rübe und *Chenopodium capitatum* als Virusträger erkannt wurden. Es muß also bei diesen Arten — besonders bei *Senecio vulgaris*, *Papaver rhoeas* und *Polygonum convolvulus* — damit gerechnet werden, daß neben eindeutig manifestierenden Pflanzen auch symptomlose Trägerpflanzen vorkommen, welche in den Zahlen des erkennbaren Infektionserfolges nicht mit erfaßt werden können.

Die Ausbildung von Wachstumshemmungen und Blattsymptomen verschiebt sich im Laufe des Jahres bei den einzelnen Arten z. T. recht erheblich (vgl. Tabelle 4). Zeitliches Auftreten sowie Art und Intensität der Symptomausprägung sind bei virusinfizierten Pflanzen von vielen Umständen abhängig. Qualitative und quantitative Zusammensetzung des Infektionsmaterials, Art und Zustand des Vektors, Ort der Übertragung und physiologischer Zustand des Wirtes sind neben den aktuellen Umweltbedingungen wohl als wichtigste Faktoren zu nennen; unter letzteren spielen Temperatur sowie Qualität und Quantität der Belichtung eine besondere Rolle (1, 43). Wir waren bei unseren Versuchen darauf bedacht, daß nach Möglichkeit nur der physiologische Zustand des Wirtes und die aktuellen Umweltbedingungen variierten. Daher glauben wir, daß wir die jahreszeitlichen Unterschiede in der Symptomausbildung auf bestimmten Wirtspflanzen hauptsächlich der Veränderung dieser beiden Faktoren zuschreiben dürfen.

Ein auffälliges Symptom, welches bei allen untersuchten Arten — eine Ausnahme bildete nur *Thlaspi arvense* — beobachtet wurde, waren die Rotfärbungen der Blätter. Vermutlich sind sie auf eine verstärkte Anthocyanbildung zurückzuführen und wohl mit einer Anhäufung von Kohlenhydraten in den Blättern in Zusammenhang zu bringen. In den Blättern vergilbungsranker Rüben wurde dies bereits nachgewiesen (18, 45). Bei den infizierten Unkräutern ist sie wahrscheinlich, da die erhöhte Turgeszenz und die Brüchigkeit — ähnlich wie bei der Rübe — auf eine Assimilatstauung schließen läßt. Das Fehlen jeglicher Rotfärbung bei *Thlaspi arvense* ist offensichtlich durch die Konstitution der Pflanze bedingt. Ein Zusammenhang mit der Veränderung des Virus in dieser Art besteht sicher nicht, da auch das durch die *Thlaspi*-Passage abgeschwächte Virus an anderen Unkräutern rote Verfärbungen hervorruft.

## 2. Der Passageeffekt und die Spezialisierung der Vergilbungsviren

In den letzten Jahren wurde mehrfach über Virulenzänderungen pflanzenpathogener Viren nach einer Passage über nicht völlig „kongeniale“ Wirtspflanzen berichtet. So erhielt JOHNSON (24) bei der Passage des TMV

über *Eryngium aquaticum* bei Rückinfektion auf Tabak nur abgeschwächte Symptome. Weitere Versuche ergaben, daß eine Herausfilterung eines schwachen, sonst maskierten TMV-Stammes dadurch erfolgt war, daß dieser sich in *Eryngium aquaticum* systemisch ausbreiten konnte; die stark schädigenden Viruskomponenten blieben dagegen durch Nekrosebildung lokal begrenzt. Auch das Kartoffel-X-Virus konnte durch Passage über Tabak (9) und Zuckerrübe (35) abgeschwächt werden. Ebenso büßte das Curly-top-Virus der Zuckerrübe bei der Passage über *Chenopodium murale*, *Rumex crispus* und *Suaeda moquini* einen Teil seiner Virulenz ein (12); diese wurde jedoch durch eine weitere Passage über *Stellaria media* wiederhergestellt (28). Für die Deutung dieser Versuche ist es wichtig, daß in den letzten Jahrzehnten sowohl für das Kartoffel-X-Virus als auch für das Curly-top-Virus eine große Anzahl verschiedener Stämme nachgewiesen wurde.

In unseren Versuchen veränderten sich alle auf *Capsella bursa pastoris* und *Thlaspi arvense* vermehrten Virusisolate in der Richtung, daß bei Rückinfektion auf Rübe eine verspätete und abgeschwächte Ausbildung der Blattsymptome erfolgte. Wachstumshemmungen unterblieben und oft zeigten diese Pflanzen ein kräftigeres und besseres Blattwachstum (ähnlich dem von tetraploiden Rüben) als die Kontrollpflanzen. Auch das auf die ursprünglichen Virusisolate heftig reagierende *Chenopodium capitatum* blieb nach Infektion mit diesem „Stamm“ symptomlos und kann ihm vermutlich nicht als Wirtspflanze dienen. Weitere Passageversuche mit Unkräutern und Rübe ließen keine neue Veränderung dieses abgeschwächten Virus erkennen; dies deutet darauf hin, daß dieses Isolat aus nur wenigen Komponenten oder vielleicht nur einer einzigen besteht, d. h., daß wir es hier eventuell mit einem reinen Virus-„Stamm“ zu tun haben.

Eine Deutung dieses Passageeffektes kann mit einer quantitativ unterschiedlichen Virusaufnahme der Vektoren, einer modifizierenden oder mutativen Veränderung des Virus oder aber durch einen Selektionsmechanismus im Passagewirt versucht werden.

Unsere Versuchsbedingungen und die Passageversuche schließen eine Erklärung auf Grund einer quantitativ unterschiedlichen Virusentnahme aus dem Passagewirt und einer Virulenzänderung im Sinne einer „Modifikation“ als unwahrscheinlich aus. In beiden Fällen hätten sich bei den fortgesetzten Passageversuchen wenigstens einmal abweichende oder auch die ursprünglichen Symptome zeigen müssen; dies trat aber in keinem Falle ein.

Ein Auftreten von Mutationen ist bei vielen zoo- und pflanzenpathogenen Viren und Bakteriophagen nachgewiesen worden (1, 26, 29, 39). Auch bei den Vergilbung erzeugenden Viren ist mit ihrem Auftreten zu rechnen; denn es hat sich in den letzten Jahren ergeben, daß die Vergilbungskrankheit durch eine Reihe von Viren verursacht wird, deren Beziehungen untereinander jedoch noch ungeklärt sind (2, 3, 13, 36, 45).

Bei den in unseren Versuchen verwendeten Virusisolaten, die sich in ihrer Symptomausbildung auf der Rübe und ihrem verschiedenen Schädigungs-

ungsgrad auf der Rübe unterscheiden, handelt es sich jedoch nicht um reine „Stämme“, sondern um Anreicherungen einzelner Komponenten in einem Virusgemisch. Hierauf deuten die Symptomabweichungen hin, die nach Infektion einer größeren Anzahl Rüben bei einzelnen Pflanzen auftraten. Dies kann einmal durch ein verschiedenartiges Ansprechen einzelner Pflanzen gegenüber der Virusinfektion verursacht sein; zum anderen kann aber auch das Gleichgewicht des Virusgemisches durch mangelhafte oder gar ausbleibende Übertragung einer Komponente durch den Vektor gestört sein.

Das Vorkommen von Mutationen bei den Vergilbungsviren ist also durchaus möglich. Es ist jedoch unwahrscheinlich, daß der Passageeffekt auf diese Weise zustande gekommen ist; denn nach Passage verschiedener Virusisolate über *Capsella bursa pastoris* und *Thlaspi arvense* zeigten sich auf der Rübe immer die gleichen abgeschwächten Symptome, d. h. es wurde wahrscheinlich immer der gleiche Virustyp erhalten. Im Falle einer Mutation müßte diese so gerichtet sein, daß aus verschiedenen Virusisolaten immer nur der eine bestimmte Typ gebildet wird; das Auftreten derartig scharf gerichteter Mutationen ist aber bis heute in keinem Falle nachgewiesen.

Es liegt daher näher, den Passageeffekt als Folge eines Selektionsprozesses zu deuten. Danach wirken *Capsella bursa pastoris* und *Thlaspi arvense* als „Filterpflanzen“ und sieben aus einem Viruskomplex eine sonst maskierte Komponente heraus. Selbstverständlich kann nichts Endgültiges über den Vorgang der Ausschaltung einzelner Viruskomponenten gesagt werden. Es bleibt daher die Frage offen, ob solche Viren infolge stofflicher Änderungen, welche durch physiologische Vorgänge in den betreffenden „Filterpflanzen“ bedingt sind, für den Vektor unangreifbar werden oder vom Vektor in dieser chemisch veränderten Form inaktiviert bzw. nicht übertragen werden. Ähnlich wie bei den Versuchen von JOHNSON (24) wäre eine andere Deutung dadurch möglich, daß im Passagewirt eine systemische Verbreitung nur durch den schwachen Virus-„Stamm“ erfolgt, während die stärker virulenten Komponenten des Viruskomplexes durch Nekrosebildung lokalisiert werden.

Mit diesem Passageeffekt wird erstmalig eine einfach zu reproduzierende Methode gezeigt, die es jederzeit gestattet, ein bestimmtes Virusisolat des Vergilbungsvirus von hohem Reinheitsgrad zu erhalten. Bis jetzt war die Auftrennung von Virusgemischen, die nicht oder nur sehr schlecht mechanisch übertragen werden, nicht einfach. Eine Isolierung einzelner Virus-„Stämme“ durch eine spezifische Übertragung verschiedener Vektorenarten, wie es BLACK (11) beim potato-yellow-dwarf-virus und BHARGAVA (zit. nach 1) beim Gurkenmosaikvirus gelang, wurde bei den Vergilbungsviren noch nicht versucht. Wie jedoch die Untersuchungen von STEUDEL (44) und SCHLÖSSER und BECKER (unveröff.) zeigen, scheinen hier auch noch Auftrennungsmöglichkeiten vorzuliegen. Weiterhin ist eine Abspaltung einzelner Virusisolate durch ihre verschiedene thermale Empfindlichkeit gegeben (27); für den Vergilbungsviruskomplex liegen aber noch keine näheren Untersuchungen vor.

Eine Auftrennung von Virusvarianten durch Isolierung von Einzelläsionen ist bei den Vergilbungsviren nicht möglich. Hier kann die Isolierung



einzelner Formen nur durch Selektion erkrankter Einzerrüben mit unterschiedlicher Symptomausprägung aus einer großen Anzahl uninfizierter Pflanzen versucht werden. Durch wiederholte Selektion und Abimpfung, eventuell mit verschiedenen oder sukzessiven Saugzeiten der Vektoren, erhält man dann relativ konstante Virusgemische, in denen eine Komponente dominiert. Auf diese Weise wurden auch die in unseren Versuchen verwendeten Isolate gewonnen.

Die selektive Wirkung einer Passage des Vergilbungsvirus über *Capsella bursa pastoris* und *Thlaspi arvense* bietet jedoch eine relativ einfache und reproduzierbare Methode der Abtrennung; ob die dabei gewonnenen Virusisolate identisch sind, konnte bis jetzt noch nicht festgestellt werden. Es werden hierbei auch nur weniger stark virulente Isolate erhalten. Ohne Zweifel werden sich aber weitere Passagewirte finden lassen, die auch eine Abtrennung stark wirksamer Vergilbungsviren erlauben.

### 3. Die Art der Schädigung verschiedener Wirtspflanzen

Die unveröffentlichten Ergebnisse SCHLÖSSERS über die verschiedenartige Beeinflussung des Ertrages und der Zusammensetzung von Zuckerrüben durch verschiedene Virusisolate regten uns an, nach ähnlichen Unterschieden im Ertrag, Aschegehalt und Stickstoffgehalt bei Nicht-Chenopodiaceen zu suchen. Absichtlich wurden die Untersuchungen an *Capsella bursa pastoris* durchgeführt, da diese Art unter Gewächshausbedingungen schnell und gut wuchs; außerdem war von dieser Art bereits eine Sippe vorhanden, die durch mehrmalige Inzucht in ihrer Variationsbreite eingeschränkt war. Erst nach Abschluß der Analysen mußten wir feststellen, daß gerade *Capsella bursa pastoris* die Viren zu verändern vermag. Dies schränkt den Wert der zu besprechenden Ergebnisse ein; die stark ausgeprägten Unterschiede in der Auswirkung der Virose rechtfertigen jedoch ihre nähere Erörterung.

#### a) Quantitative Betrachtungen über die Minderung der Stoffproduktion

Als Maß der Stoffproduktion wurde in erster Linie die gebildete Pflanzenmasse herangezogen. In zwei Versuchen mit *Capsella bursa pastoris* und einem mit *Plantago major* wurde der Pflanzenertrag, gemessen an der Trockensubstanz, durch die Virusinfektion deutlich herabgesetzt (vgl. S. 91); diese Differenzen sind in fast allen Fällen signifikant. Die zum Teil starke Verminderung der Stoffproduktion durch die Virusinfektion stimmt mit ähnlichen Befunden an der Zuckerrübe überein (22, 45).

Das Ausmaß des Produktionsausfalles durch die einzelnen Virusisolate ist recht verschieden und nur zum Teil signifikant; in anderen Fällen weisen die Differenzen nur gewisse Tendenzen auf. So liegen die Ergebnisse aller drei Versuche in der Richtung, daß die Isolate Mi und Na den Masseertrag am stärksten herabsetzen, DP, GF und Fe dagegen weniger. Obwohl zwischen den beiden mit *Capsella bursa pastoris* durchgeführten Versuchen ein zeitlicher Abstand von zwei Monaten lag, stimmen sie in ihren Ergebnissen weitgehend überein; die Abstufung des Schädigungsgrades, gemessen an der Trock-

kensubstanzabnahme, lag bei ihnen gleich:  $\text{Na} > \text{Mi} > \text{Fe} > \text{GF} > \text{DP}$ . Bei der Rübe (s. Tabelle 9) beeinflussten dagegen die Infektionen mit Mi und DP den Ertrag am stärksten und mit Na am wenigsten.

Tabelle 9

Einwirkung verschiedener Virusisolate auf den Masseertrag verschiedener Pflanzen

Rübe 9819 <sup>+</sup>	<i>Capsella b. p.</i>	<i>Plantago m.</i>	Schädigung
Na	DP	DP	schwach
GF	GF	Fe	
Fe	Fe	GF	↓
Mi	Mi	Na	
DP	Na	Mi	stark

Auch *Plantago major* wird durch die einzelnen Isolate unterschiedlich geschädigt. Die Werte des Frisch- und Trockengewichtes laufen bei diesen Versuchen parallel und lassen folgende Abstufung im Schädigungsgrad erkennen:  $\text{Mi} > \text{Na} > \text{GF} > \text{Fe} > \text{DP}$ . Hierbei ist bemerkenswert, daß bei Rückinfektionen von erkrankten *Plantago*-Pflanzen auf Rübe keine Anzeichen einer erfolgreichen Infektion beobachtet werden konnten; dies bestätigt die Ergebnisse von HANSEN (17). Daß die Schädigungen von *Plantago major* durch den Saugakt der Läuse hervorgerufen wurden, ist unwahrscheinlich, da auch die Kontrollpflanzen mit einer gleichen Anzahl gesunder Läuse besetzt wurden. Es ist eher anzunehmen, daß das Virus in die Pflanze eindringen und sie entsprechend schädigen konnte. Von diesen Pflanzen war jedoch eine weitere mechanische oder vektorielle Übertragung nicht mehr möglich. Eine Erklärung dieser Erscheinung läßt sich heute noch nicht geben; eine allmähliche Inaktivierung des Virus liegt dabei im Bereich der Möglichkeiten.

Die bei den drei Versuchen festgestellten Schwankungen des Wassergehaltes sind nur geringfügig; auffällig ist allerdings, daß bei beiden *Capsella*-Versuchen die mit GF infizierten Pflanzen den geringsten Wassergehalt aufweisen.

Zur weiteren Charakterisierung der Einwirkung verschiedener Virusisolate auf die befallenen Pflanzen wurde der Samen ertrag und die Samenqualität von *Capsella bursa pastoris* und *Thlaspi arvense* bestimmt. Der Einfluß der Viren auf diese beiden Pflanzenarten ist nicht gleichartig (vgl. Tabelle 5).

Der Samen ertrag infizierter *Capsella*-Pflanzen ist gegenüber dem der Kontrollpflanzen signifikant stark herabgesetzt, während die Wirkung der einzelnen Isolate untereinander nur zum Teil gesichert ist. Die Verminderung der Samenqualität, ausgedrückt durch das Hundertkorngewicht, zeigt größere Schwankungen, die nur in einigen Fällen signifikant sind. Im allgemeinen geht sie dem Symptombild parallel, während dies bei den Werten des Samen ertrages nicht festgestellt werden kann.

Bei *Thlaspi arvense* dagegen verlaufen die Werte des Samen ertrages, des Hundertkorngewichtes und die Stärke der Symptomausbildung in der

gleichen Richtung; am stärksten schädigt das Isolat GF, dann folgen Mi, Na, DP und Fe. Gegenüber der Kontrolle ist die Ertrags- und Qualitätsminderung durch die verschiedenen Virusisolate in allen Fällen eindeutig. Innerhalb der mit den verschiedenen Virusisolaten infizierten Pflanzen lassen sich dagegen nur bei Hundertkorngewicht zum Teil gesicherte Unterschiede feststellen; der Samenertrag schwankt in geringerem Maße in der schon angedeuteten Reihenfolge, ohne daß signifikante Unterschiede auftreten.

#### b) Der Einfluß verschiedener Virusisolate auf den Chemismus von *Capsella bursa pastoris*

Die Untersuchung des Einflusses verschiedener Virusisolate wurde am zweiten Ertragsversuch mit *Capsella bursa pastoris* durch Asche- und Stickstoffbestimmungen ergänzt.

Der Aschegehalt wird in allen Fällen durch die Virusinfektion vermindert (vgl. Tabelle 7). Die Ursache dieser Veränderung läßt sich aus unseren Versuchen nicht unmittelbar ableiten. Es sind aber zwei Möglichkeiten ins Auge zu fassen; entweder handelt es sich um eine echte Verschiebung im Mineralstoffgehalt, welche durch Veränderung der Permeabilitätsverhältnisse der aufnehmenden Organe oder durch Hemmung des Salztransportes bedingt ist; oder die Veränderung des Aschegehaltes der Trockensubstanz wird dadurch vorgetäuscht, daß die Menge der verglühbaren Substanz — in der Hauptsache wohl Kohlenhydrate — in den infizierten Pflanzen größer ist. Ob die im Rübenblatt als Folge der Assimilatstauung nachgewiesene Anhäufung von Kohlenhydraten (18, 45) auch bei *Capsella bursa pastoris* auftritt, konnte aus technischen Gründen nicht untersucht werden. Die bei den infizierten Pflanzen aufgetretene Anthocyanbildung und die spröde, brüchige Struktur der älteren Blätter deuten jedoch darauf hin.

Die Unterschiede im Gesamt-N-Gehalt sind im wesentlichen dadurch bestimmt, daß der Gehalt an Protein-N in allen infizierten Pflanzen — wenn auch in wechselndem Maße — erhöht ist. Nach Infektion mit den Isolaten Fe und DP wird diese Zunahme des Protein-N durch eine starke Verminderung des Gehaltes an löslichem N aufgehoben. Nach Infektion mit den anderen Virusisolaten ist auch der Gehalt an löslichem N erhöht; dies gilt besonders für die Wirkung des Isolates Mi. Hier ist die relative Steigerung des Gehaltes an löslichem N größer als die Zunahme des Protein-N. Dadurch wird in diesem einen Falle der Quotient Protein-N : lösliches N im Verhältnis zur nichtinfizierten Kontrolle erniedrigt; in allen anderen Fällen ist dieser Quotient erhöht, in besonderem Maße bei der Infektion mit den Isolaten Fe und DP. Diese Werte zeigen deutlich, daß trotz eines scheinbar normalen Gehaltes an Gesamt-N der N-Stoffwechsel durch die Virusinfektion stark beeinflusst sein kann.

Die verschiedenen Isolate des Vergilbungsvirus der Rübe scheinen auf die einzelnen Pflanzenarten unterschiedlich einzuwirken. Dies zeigen die Ertragsversuche mit *Capsella bursa pastoris*, *Thlaspi arvense* und *Plantago major*; jedoch auch die Asche- und N-Bestimmungen bei *Capsella bursa*



*pastoris* deuten darauf hin. Während der Aschegehalt der Rübe durch die Infektion allgemein erhöht wird (22, 45), ist bei *Capsella bursa pastoris* das Gegenteil der Fall. Umgekehrt verhält es sich mit dem Quotienten Protein-N : löslichem N; bei *Capsella bursa pastoris* wird er durch die Infektion erhöht und bei der Rübe erniedrigt (22).

Über die stoffwechselphysiologischen Vorgänge in diesen beiden Pflanzenarten ist nicht viel bekannt. Auf Grund der unterschiedlichen Auswirkung der Infektion mit ein und demselben Virusisolat kann man jedoch vermuten, daß bei diesen Arten wesentliche Unterschiede bestehen; oder aber man muß annehmen, daß in den beiden Wirtsarten verschiedene Komponenten eines Virusgemisches wirksam werden und eine unterschiedliche Schädigung der Pflanzen hervorrufen.

#### 4. Die Bedeutung der Unkräuter für Erhaltung und Verbreitung des Vergilbungsvirus der Rübe

Beim Studium der Epidemiologie pflanzlicher Virosen in den USA hatte es sich ergeben (26, 49), daß Unkräuter und Zierpflanzen eine nicht unbedeutende Rolle bei der Überwinterung dieser Krankheiten spielen können. Auch in Europa hat man in letzter Zeit die Bedeutung der Nebenwirte erkannt (20, 47), und unsere Aufgabe war es, diese auch für die viröse Vergilbung der *Beta*-Rüben näher zu untersuchen.

Als Wirtspflanzen des Vergilbungsvirus wurden bis vor kurzem nur die folgenden Arten genannt (18, 21, 26): *Beta vulgaris*, *B. cicla*, *B. maritima*, *Spinacia oleracea*, *Atriplex hortensis*, *A. sibirica*, *Chenopodium foliosum*, *Ch. polyspermum*, *Ch. album*, *Suaeda splendens* und *Amarantus retroflexus*. Bereits im Jahre 1952 hat jedoch SCHLÖSSER (37) *Capsella bursa pastoris* und *Senecio vulgaris* als Wirtspflanzen des Vergilbungs- und Mosaikvirus erkannt; er vermutete, daß noch andere Unkräuter eine ähnliche Rolle spielen können. Beobachtungen der Flora von Rübenfeldern gaben einige Hinweise, auf Grund derer wir insgesamt 21 Arten durch künstliche Infektion mit verschiedenen Virusisolaten auf ihre Anfälligkeit für dieses Virus untersuchten (38). Als völlig unanfällig erwiesen sich *Plantago lanceolata*, *Rumex acetosella*, *Sonchus arvensis*, *S. asper*, *Achillea millefolium*, *Matricaria chamomilla*, *M. inodora*, *Taraxacum officinale*, *Datura stramonium*, *Urtica dioica* und *Trifolium incarnatum*. *Plantago major* wurde durch das Virus deutlich beeinträchtigt, jedoch ließ es sich von dieser Art nicht wieder auf Rübe übertragen. Daher ist die Bedeutung von *Plantago major* als möglicher Nebenwirt noch nicht völlig geklärt; eine verwandte Art, *Plantago erecta*, wurde jedoch inzwischen als anfällig erkannt (8).

Die erfolgreichen Rückinfektionen von *Capsella bursa pastoris*, *Thlaspi arvense*, *Polygonum convolvulus*, *Papaver rhoeas*, *Atriplex nitens*, *Chenopodium ficifolium* und *Senecio vulgaris* kennzeichnen diese jedoch als potentielle Nebenwirte des Vergilbungsvirus. Da auch ein Isolat „Mischinfektion“ verwendet wurde, das neben einem Vergilbungs- auch ein Mosaikvirus enthält, konnte gleichzeitig die Mosaikanfälligkeit überprüft werden. Als neue

Wirtspflanzen des Rübenmosaik wurden dabei *Chenopodium ficifolium* und *Senecio vulgaris* gefunden, und die Anfälligkeit von *Capsella bursa pastoris*, *Trifolium incarnatum*, *Papaver rhoeas* konnte hierbei bestätigt werden (5, 42, 48).

Auf Grund unserer Gewächshausversuche kann die praktische Bedeutung dieser Unkrautarten für Erhaltung und Verbreitung des Vergilbungsvirus nur als Möglichkeit diskutiert werden. Erst umfangreiche Freilandversuche können diese Frage restlos klären; vor allen Dingen müßten hierzu Unterlagen bereitgestellt werden, wie häufig virusinfizierte Unkräuter in den verschiedenen Klimagebieten auftreten. In der Umgebung von Einbeck fanden wir im Jahre 1954 von allen hier als Infektionsträger erkannten Arten zahlreiche verdächtige Exemplare. Durch Abimpfung mittels gesunder Läuse konnte in vielen Fällen in solchen Pflanzen, besonders in *Capsella bursa pastoris*, *Thlaspi arvense*, *Papaver rhoeas* und *Senecio vulgaris*, das Vergilbungsvirus und weniger häufig eine Mischinfektion festgestellt werden. Auch BENNETT und COSTA (8) haben kürzlich berichtet, daß in Kalifornien innerhalb und in der Nähe von Rüben- und Spinatfeldern *Chenopodium album* zu einem hohen und *Chenopodium murale* zu einem geringeren Prozentsatz mit dem Vergilbungsvirus infiziert sind. Sie glauben jedoch nicht, daß diese Arten für die weitere Verbreitung der Vergilbungskrankheit bedeutungsvoll sind.

Die obengenannten Arten sind größtenteils einjährige Samenunkräuter (53). Jedoch können *Capsella bursa pastoris*, *Thlaspi arvense*, *Papaver rhoeas* und *Senecio vulgaris* in klimatisch günstigen Gebieten mehrere Generationen in einer Vegetationsperiode erzeugen und den Winter vegetativ überdauern.

Eine Übertragung des Virus durch den Samen dieser Arten konnte nicht nachgewiesen werden. Es kann jedoch durch vegetative Überwinterung der im Herbst infizierten Pflanzen auch die Überwinterung des Virus in den unterirdischen Teilen und der Rosette der Pflanzen ermöglicht werden. Die Tatsache, daß das Virus in Winterspinatkulturen den Winter überdauert, zeigt, daß winterliche Temperaturen das Virus nicht wesentlich beeinflussen.

Neben den bekannten Überwinterungsmöglichkeiten in Rübenstecklingen und Winterspinatbeständen, mancherorts auch in Rübenmieten, bieten also anfällige Unkräuter eine weitere Gelegenheit zur Überwinterung und Verbreitung des Vergilbungsvirus, welche bisher bei Bekämpfungs- und Verhütungsmaßnahmen zu wenig beachtet wurde. Ihre Rolle für die Praxis wird weitgehend durch das Klima bestimmt. So ist WENZL (54) der Ansicht, daß Unkräuter für die Verbreitung der Vergilbungskrankheit praktisch bedeutungslos sind; dies mag für kontinentale Klimagebiete Niederösterreichs bis zu einem gewissen Grade zutreffen. Für die Rübenanbaugebiete im atlantischen Klimaraum trifft diese Überlegung unseres Erachtens sicher nicht zu, wenn auch die Bedeutung der Unkräuter als Virusquelle von Gebiet zu Gebiet zweifellos wechselt. Da diese Arten aber bereits frühzeitig im Jahre zur Verfügung stehen, können sie bei frühem Läuseflug ein besonders gefährlicher Infektionsherd werden. Daß die untersuchten Arten von *Myzodes persicae*

als Futterpflanze angenommen werden, zeigen nicht nur unsere Versuche, sondern auch Freilandbeobachtungen im Jahre 1954.

Eine Überwinterung der Vektoren auf Unkrautpflanzen ist allerdings unwahrscheinlich, da das Mikroklima ihrer Standorte zu ungünstig sein wird; jedoch finden die von anderen Überwinterungsstellen frühzeitig abfliegenden Blattläuse auf den Unkräutern Gelegenheit, sich mit Rübenviren zu beladen. Dies gilt ganz besonders für Gebiete, in welchen anholozyklische Überwinterung der Vektoren möglich ist und Blattläuse im Frühjahr auf Unkräuter als Nahrungspflanzen angewiesen sind. Dagegen ist die Bedeutung der Virusübertragung in Gebieten, in denen die Blattläuse etwas später im Jahr vom Winterwirt abfliegen, nicht ganz so groß; jedoch besteht auch hier die Möglichkeit, daß sich die Blattläuse zuerst auf viruskranken Unkräutern niederlassen und dann die Rübenbestände verseucht anfliegen.

In Mittel- und Norddeutschland kommt der von uns festgestellten Übertragungsmöglichkeit durch *Cuscuta Gronovii* sicher keine Bedeutung zu, da Seidebefall an Rüben außerordentlich selten ist. In den oberitalienischen und jugoslawischen Anbaugebieten ist dieser jedoch häufig anzutreffen (mündl. Mitt. von SCHLÖSSER). Inwieweit hierbei die Vergilbungskrankheit von Pflanze zu Pflanze ausgebreitet werden kann, müßte jedoch noch näher untersucht werden.

#### IV. Zusammenfassung

1. Das Vergilbungsvirus kann mit Hilfe von *Cuscuta Gronovii* von Rübe zu Rübe übertragen werden. Gleichartige Versuche mit dem Rübenmosaikvirus zeigten keinen Erfolg.
2. Es wurden 21 Pflanzenarten, vorwiegend Unkräuter, mit Hilfe der Übertragung durch *Myzodes persicae* auf Anfälligkeit gegenüber dem Vergilbungs- und Mosaikvirus geprüft.
3. Von diesen erwiesen sich *Capsella bursa pastoris*, *Thlaspi arvense*, *Polygonum convolvulus*, *Papaver rhoeas*, *Chenopodium ficifolium*, *Atriplex nitens* und *Senecio vulgaris* als Wirtspflanzen des Vergilbungsvirus und *Chenopodium ficifolium*, *Senecio vulgaris*, *Capsella bursa pastoris*, *Papaver rhoeas* und *Trifolium incarnatum* als solche des Mosaikvirus der Rübe.
4. Versuche, die Viren durch den Samen anfälliger Arten zu übertragen, verliefen ergebnislos.
5. Trotz deutlicher Schädigung infizierter Pflanzen von *Plantago major* konnte von diesen das Virus weder auf vektoriellem noch auf mechanischem Wege auf die Rübe rückübertragen werden.
6. Das Auftreten verschiedener „Stämme“ des Vergilbungsvirus konnte durch ihre unterschiedliche Einwirkung auf den Trockensubstanzertrag von *Capsella bursa pastoris* und *Plantago major* bestätigt werden; weitere Unterschiede wurden im Samenertrag, Aschegehalt und Stickstoffgehalt von *Capsella bursa pastoris* gefunden.
7. Bei der Passage verschiedener Virusisolate über *Capsella bursa pastoris* und *Thlaspi arvense* zeigten sich bei Rückübertragungen auf der Rübe nur schwache Symptome. Ein von *Thlaspi arvense* gewonnenes abge-



schwächstes Isolat des Vergilbungsvirus veränderte sein Symptombild während mehrfacher Passagen über Rübenpflanzen nicht. Es wird deshalb vermutet, daß dieses Isolat aus nur wenigen oder einer einzigen Komponente besteht.

8. Die Bedeutung der Ergebnisse für die Frage der Spezialisierung und Überwinterung des Vergilbungsvirus der *Beta*-Rüben wurde erörtert.

### Literaturverzeichnis

1. BAWDEN, F. C., 1950: Plant viruses and virus diseases. 3. ed., Waltham (Masse.).
2. — —, 1952: Rothamsted Exp. Stat., Harpenden, Report for 1951, 76.
3. — —, 1953: Rothamsted Exp. Stat., Harpenden, Report for 1952, 79.
4. — —, HAMLYN, B. M. G. and WATSON, M. A., 1954: The distribution of viruses in different leaf tissues. *Ann. appl. Biol.* 229.
5. BENNETT, C. W., 1949: Some unreported host plants of sugar beet mosaic virus. *Phytopathology* 39, 669.
6. — —, 1944: Studies of dodder transmission of plant viruses. *Phytopathology* 34, 905.
7. — —, 1953: Interactions between viruses and virus strains. *Advanc. in Virus Res.* 1, 40.
8. — — and COSTA, A. S., 1954: Observation and studies of virus yellows of sugar beet in California. *Proc. Am. Soc. of Sugar beet Tech.* 8, 230.
9. BERCKS, R., 1953: Über die Möglichkeit einer Virulenzänderung des Kartoffel-X-Virus. *Phytopath. Z.* 20, 113.
10. BJÖRLING, K., 1954: Yellowing in beets caused by magnesium deficiency. *Socker* 8, 147.
11. BLACK, L. M., 1941: Specific transmission of varieties of potato yellow dwarf virus by related insects. *Amer. Potato J.* 18, 231.
12. CARSNER, E. and LACKEY, F. C., 1928: Further study on attenuation of the virus of sugar beet curly top. *Phytopathology* 18, 951.
13. CLINCH, PH. E. M. and LOUGHNANE, J. B., 1948: Seed transmission of virus yellows of sugar beet (*Beta vulgaris*) and the existence of strains of this virus in Eire. *Scient. Proc. Roy. Dublin Soc. (NS)* 24, 307.
14. ESAU, K., 1944: Anatomical and cytological studies on beet mosaic. *J. Agric. Res.* 69, 95.
15. FUCHS, W. H. und BEISS, U., 1954: Übertragung des Rübengelbsucht-Virus (*Corium betae*) mit Hilfe von *Cuscuta*. *Naturwissenschaften* 41, 506.
16. GIDDINGS, N. J., 1944: Additional strains of sugar beet curly top virus. *J. Agric. Res.* 69, 149.
17. HANSEN, H. P., 1950: Investigations of virus yellows of beets in Denmark. *Trans. Danish Acad. techn. Sci.* 1, 1.
18. HARTSUIJKER, K., 1951: De Vergelingsziekte der bieten. I. Samenvattend verslag over het onderzoek in de jaren 1940—1948. *Meded. Inst. rat. Suikerproductie, Bergen op Zoom*, 21, 17.
19. — —, 1952: Extra nummer over de Vergelingsziekte. *De Suikerbiet* 6, 22.
20. HEIN, A., 1954: Die Bedeutung der Unkräuter für die Epidemiologie pflanzlicher Virosen. *Dtsch. Landwirtschaft* 4, 521.
21. HEINZE, K., 1953: Die Schädlinge, Krankheiten und Schädigungen unserer Hackfrüchte. Berlin.
22. HENKE, O., 1954: Untersuchungen des Stoffwechsels vergilbungsranker Zuckerrüben. *Zbl. Bakt.* 108, Abt. II, 134.
23. HULL, A., 1951: Report on virus yellows in Europe. 14<sup>th</sup> Congr. of the I. I. R. B., Brüssel.
24. JOHNSON, J., 1947: Virus attenuation and the separation of strains by specific hosts. *Phytopathology* 37, 822.
25. KASSANIS, B., 1949: The transmission of sugar beet yellows virus by mechanical inoculation. *Ann. appl. Biol.* 36, 270.

26. KÖHLER, E. und KLINKOWSKI, M., 1954: Handbuch der Pflanzenkrankheiten. Bd. 2: Viruskrankheiten. 2. Aufl. Paul Parey, Berlin.
27. KUNKEL, L. O., 1937: Effect of heat on ability of *Cicadula sexnotata* (Fall) to transmit aster yellows. Am. J. Bot. **24**, 316.
28. LACKEY, C. F., 1932: Restoration of virulence of attenuated curly top by passage through *Stellaria media*. J. Agric. Res. **44**, 755.
29. LURIA, S. E., 1953: General Virology. John Wiley & Sons, Inc. New York.
30. MUDRA, A., 1952: Einführung in die Methodik der Feldversuche. Leipzig.
31. PARNAS, J. K., 1938: Über die Ausführung der Stickstoffbestimmung nach KJELDAHL in der Modifikation von PARNAS und WAGNER. Z. anal. Chemie **114**, 261.
32. QUANJER, H. M., 1934: Enkele kenmerken der vergelingsziekte van suiker- en voederbieten ter onderscheiding van de „swarte houtvatenziekte“. T. Plantenziekten **40**, 201.
33. — — und ROLAND, G., 1936: De vergelingsziekte en de mozaiekziekte van de suiker- en voederbiet. T. Plantenziekten **42**, 45.
34. RIETBERG, H., 1951: De Vergelingsziekte der bieten. II. Aanvullende opmerkingen bij het verslag over 1940—1948. Meded. Inst. rat. Suikerproductie, Bergen op Zoom **21**, 277.
35. SALAMAN, R. N., 1938: The potato virus „X“: its strains and reactions. Philos. transact. roy. Soc. London, B. **229**, 137.
36. SCHLÖSSER, L. A., 1952: Zur Frage der Wanderung europäischer Rübenvirosen. Phytopath. Z. **20**, 75.
37. — —, 1952: Gegenwartsfragen der Zuckerrüben- und Futterrübenzüchtung. Arch. dtsh. Landw.-Ges. **10**, 64.
38. — —, FUCHS, W. H. und BEISS, U., 1955: Über die Wirtsunkräuter des Rübengelbsuchtvirus (*Corium betae*). Nachr.bl. dtsh. Pfl.schutzd., **7**, 59, Braunschweig.
39. SCHRAMM, G., 1954: Die Biochemie der Viren. Berlin 1954.
40. VAN SCHREVEN, D. A., 1936: De vergelingsziekte bij de biet en haar oorzaak. Meded. Inst. rat. Suikerproductie, Bergen op Zoom, **6**, 1.
41. SEDLAG, U., 1954: Konstanz und Relativität des Erfolges bei Infektionsversuchen mit dem Virus der „virösen Vergilbung der Rübe“. Nachr.bl. dtsh. Pfl.schutzd. **8**, 101, Berlin.
42. SEVERIN, H. und DRAKE, R. M., 1947: Weeds experimental infected with beet mosaic virus. Hilgardia **17**, 569.
43. SMITH, K. M., 1951: Recent Advances in the Study of Plant Viruses. London.
44. STEUDEL, W., 1954: Diskussionsbemerkungen. C. r. 17. Congr. I. I. R. B., Brüssel.
45. — — und HEILING, A., 1954: Die Vergilbungskrankheit der Rübe. Mitt. Biol. Zentralanst. H. **79**, 127 S.
46. SYLVESTER, E. S., 1947: Influence of fasting in the transmission of the beet mosaic virus by the green peach aphid. Phytopathology **37**, 528.
47. USCHDRAWITZ, H. A., 1954: Die Bedeutung der Stauden für die Virusverbreitung. Mitt. Biol. Bundesanst. H. **81**, 25.
48. WALKER, J. C., 1952: Diseases of vegetable crops. London.
49. WALLACE, J. M. and MURPHY, A. M., 1938: Studies on the epidemiology of curly top in southern Idaho, with special reference to sugar beets and weed hosts of the vector *Eutettix tenellus*. U. S. Dept. Agr. Techn. Bull. **624**, 46 S.
50. WATSON, M. A., 1946: The transmission of beet mosaic and beet yellows viruses by aphids; a comparative study of a non-persistent virus having host plants and vector common. Proc. Roy. Soc. London **133**, 200.
51. — —, HULL, R. and HARTSUIJKER, K., 1949: Yellowing disease of „family 41“ sugar beet. Nature **163**, 910.
52. WEBER, E., 1948: Grundriß der biologischen Statistik für Naturwissenschaftler und Mediziner. Jena.
53. WEHSARG, O., 1954: Ackerunkräuter. Berlin.
54. WENZL, H., 1954: Beobachtungen zur Frage der Überwinterung des Vergilbungsvirus in den österreichischen Zuckerrübengebieten. Pflanzenschutzberichte **12**, 88.

*Aus der Biologischen Bundesanstalt, Institut für landwirtschaftliche  
Virusforschung, Braunschweig*

## **Elektronenmikroskopische Untersuchungen über Kartoffelviren**

### **III. Vermessungen an Teilchen des Kartoffel-Y-Virus**

Von

O. BODE und H. L. PAUL

*Mit 3 Abbildungen*

Das Kartoffel-Y-Virus ist von BAWDEN und NIXON (1951), SCHRAMM (1952) und BODE (1954) morphologisch untersucht worden. Während die beiden ersten Autoren nur Angaben über die Dicke ( $10\text{ m}\mu$ ) machten und die Länge als variabel bezeichneten, bestimmte SCHRAMM die Teilchengröße zu  $700 \pm 13\text{ m}\mu$ . Von diesem Wert wich die Längenangabe BODEs ab, der  $750\text{ m}\mu$  als Normallänge feststellte. Da sich herausgestellt hat, daß die bislang geprüften Kartoffelviren jeweils eine charakteristische Normallänge besitzen, erschien eine erneute Größenbestimmung für das Kartoffel-Y-Virus erwünscht.

Der von BODE und KÖHLER (1952) geprägte Ausdruck „Normallänge“ sei zunächst erläutert, um Irrtümern oder Trugschlüssen vorzubeugen. Bei Vermessungen stäbchen- oder fadenförmiger Viren in elektronenmikroskopischen Aufnahmen erhält man Werte, die, in einem Längen-Häufigkeits-Polygon zusammengefaßt, eine bestimmte Verteilung aufweisen (vgl. Abb. 1). Das Polygon besitzt im typischen Falle einen Hauptgipfel. Seinen Mittelwert haben wir als Normallänge bezeichnet.<sup>1)</sup> Die Deutlichkeit dieses Gipfels wird von der Präparation beeinflusst: im allgemeinen läßt sich ein um so

<sup>1)</sup> Treten stets zwei oder mehrere hohe Gipfel, die nicht als Längsaggregationen gedeutet werden können, in dem Polygon auf, wie z. B. beim Rattlevirus, so läßt sich der Begriff „Normallänge“ in dieser Form nicht verwenden.



höherer Anteil der markanten Längen beobachten, je schonender die Präparation erfolgt. Weniger schonende Vorbehandlungsarten (Fällungen, hochtourige Zentrifugationen) können den Gipfel sehr abflachen und Nebengipfel (meist Halb- oder Doppelwerte der Normallänge) hervortreten lassen. Dadurch kann die Sicherheit, mit der sich die Normallänge bestimmen läßt, sehr herabgesetzt werden. Das fällt besonders ins Gewicht, wenn nur eine geringere Anzahl von Virusteilchen zur Verfügung steht. Beim Vergleichen von Virus-Normallängen sollten deswegen möglichst nur Ergebnisse verwendet werden, die mit der gleichen Methodik gewonnen wurden. Da das Virus bei derartigen Untersuchungen nicht in seiner natürlichen Umgebung vermessen wird und deshalb Veränderungen, auf die bereits WILLIAMS (1954) ausführlich hingewiesen hat, möglich sind, darf man nicht ohne weiteres folgern, daß es im natürlichen Milieu der lebenden Zelle ebenfalls in Form von „normallangen“ Partikeln vorkomme. Über die Teilchenlängen fädiger oder stäbchenförmiger Viren in der Zelle ist noch wenig bekannt; auf sie ist der Begriff der Normallänge vorerst nicht anwendbar.

### Methodik

Wie in früheren Untersuchungen (BODE und PAUL 1955, PAUL und BODE 1955) verwendeten wir für die Herstellung der Präparate teils die Exsudatmethode von JOHNSON (1951), teils bei niedriger Tourenzahl zentrifugierte Preßsäfte (PAUL und BODE 1955). Die elektronenoptische Vergrößerung betrug 5300, die bei der Vermessung der Teilchen benutzte Gesamtvergrößerung 40 000. Die Meßergebnisse wurden als Treppenvpolygone mit einer Klassenbreite von  $25\text{ m}\mu$  dargestellt.

In die Untersuchungen wurden fünf Stämme des Kartoffel-Y-Virus einbezogen, und zwar einmal die von KÖHLER isolierten Stämme G A, Go 16, Ca, D J (vgl. auch KÖHLER 1940), dann aber auch ein weiterer für Tabak hochvirulenter Stamm Lü, der mit dem von BAWDEN und KASSANIS (1951) beschriebenen „veinal necrosis“-Stamm verwandt oder identisch sein dürfte. Sämtliche Stämme wurden auf Samsuntabak gehalten und von diesem für die Untersuchungen gewonnen.

### Ergebnisse

Das Kartoffel-Y-Virus besitzt lange, fadenförmige Partikeln (Abb. 1). Die für die einzelnen Stämme erhaltenen Polygone zeigten in der Lage des Hauptgipfels keine signifikanten Abweichungen voneinander. Ebenso wenig ließen die Präparationsarten merkbliche Unterschiede zustandekommen. Deswegen konnten die Meßergebnisse an 714 Teilchen in Abb. 2 gemeinsam dargestellt werden. Für die Berechnung der Normallänge wurde



Abb. 1. Teilchen des  
Kartoffel-Y-Virus  
Vergr. 40 000 $\times$   
(Aufnahme BRANDES)



Abb. 2. Längenverteilung für die Teilchen  
der fünf Y-Virusstämme

auf Wahrscheinlichkeitspapier mit Hilfe der Hazengeraden ein Bereich ausgegrenzt, auf den sich die Rechenverfahren für die Mittelwertbildung anwenden ließen. Das war im Gebiet von 700 bis 825 m $\mu$ , in dem sich 57 %

der Teilchen (408) befanden, der Fall. Die Normallänge errechnete sich zu etwa 759 m $\mu$ . Daneben traten in geringerem Umfang auch Doppellängen von etwa 1511 m $\mu$  und Halblängen von etwa 351 m $\mu$  in Erscheinung. Auf die zu diesen Werten gehörenden Verteilungsbereiche entfielen 3,1 % bzw. 6,2 % der Partikeln.

Zur Kontrolle dieser Bestimmungen wurden Mischexsudate des Stammes Lü mit Tabakmosaikvirus untersucht. Die Meßergebnisse sind in

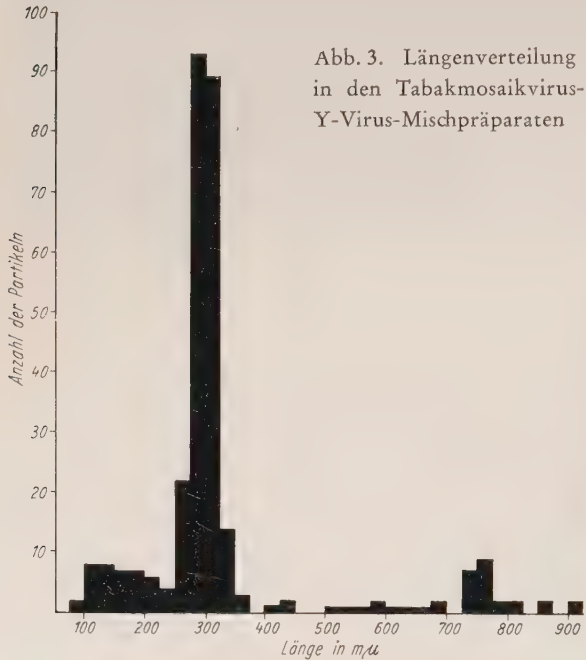


Abb. 3 dargestellt. Für das Tabakmosaikvirus ergibt sich aus ihnen eine Normallänge von 298 m $\mu$  (WILLIAMS 1954: TMV 298 m $\mu$ ) und für den Y-Stamm Lü eine solche von 756 m $\mu$ . In den Mischexsudaten wurden auch die Schattenbreiten parallel liegender Teilchen verglichen und daraus die Dicke des Y-Virus berechnet (vgl. PAUL und BODE 1955). Setzt man die Dicke des Tabakmosaikvirus mit 15 m $\mu$  an, dann hat das Y-Virus einen Durchmesser von etwa 12 m $\mu$ .

### Diskussion

Vorstehende Ergebnisse bestätigen recht gut den von BODE (1954) angegebenen Wert der Normallänge von etwa 750 m $\mu$ . Wie lassen sich aber die abweichenden Angaben SCHRAMMS deuten? Zwar hat SCHRAMM eine andere Wirtspflanze benutzt (*Nicotiana glutinosa*), doch dürfte das kaum der Grund der Abweichung sein, da die Normallänge eines Virus nicht von der Wirtspflanze abzuhängen scheint. Wir konnten z. B. in strichelkranken Kartoffelpflanzen die gleichen Normallängen beobachten, wie sie für Tabakkulturen mitgeteilt sind. Wahrscheinlicher ist, daß die völlig andere Präparationsart (Fällung plus Zentrifugation) im Verein mit einer geringeren Anzahl von Partikeln (vgl. WILLIAMS 1954) die Normallänge nicht so deutlich hat hervortreten lassen. Der an umfangreicherem Material und bei Benutzung schonender Methodik erhaltene und auch durch die Mischexsudate gestützte Wert von etwa 759 m $\mu$  erscheint uns deshalb gesichert.



Während die bisher bestimmten Kartoffelviren im Elektronenmikroskop gut unterscheidbare Längen besitzen [Rattlevirus 70 und 180 m $\mu$  (PAUL und BODE 1955), X-Virus 500—525 m $\mu$  (BODE und PAUL 1955), S-Virus 625 bis 675 m $\mu$  (WETTER und BRANDES 1955, 1956), Y-Virus 750—775 m $\mu$ ], sind neuerdings andere Viren bekannt geworden, die eine dem Y-Virus vergleichbare Länge aufweisen: das Bohnenmosaikvirus mit 750 m $\mu$  (BRANDES und QUANTZ 1955), das Wisconsin pea streak-virus mit  $750 \times 10$ —15 m $\mu$  (SKOTLAND 1953) und das Rübenmosaikvirus mit 733 m $\mu$  (ZIMMER und BRANDES 1956). Sie lassen sich im Elektronenmikroskop nicht vom Y-Virus unterscheiden, während das von COUCH und GOLD (1955) vermessene Salatmosaikvirus trotz der Länge von ebenfalls 756 m $\mu$  infolge seiner größeren Dicke (22 m $\mu$ ) von den eben genannten abzugrenzen sein dürfte. Da das Bohnenmosaik-, Rübenmosaik-, Wisconsin pea streak- und Y-Virus nach unserer bisherigen Kenntnis different sind, ist es nicht möglich, allein aus den morphologischen Daten auf verwandtschaftliche Beziehungen zu schließen.

### Zusammenfassung

Fünf Stämme des Kartoffel-Y-Virus wurden elektronenmikroskopisch untersucht. Sie besaßen lange, fadenförmige Partikeln, deren Länge etwa 759 m $\mu$  und deren Dicke etwa 12 m $\mu$  betrug. Morphologische Unterschiede zwischen den Teilchen der Stämme waren nicht zu erkennen.

### Literaturverzeichnis

- BAWDEN, F. C. and KASSANIS, B., 1951: Serologically related strains of potato virus Y that are not mutually antagonistic in plants. *Ann. appl. Biol.* **38**, 402—410.
- — and NIXON, H. L., 1951: The application of electron microscopy to the study of plant viruses in unpurified plant extracts. *J. Gen. Microbiol.* **5**, 104—109.
- BODE, O., 1954: Aktuelle Probleme der pflanzlichen Virusforschung. *Mitt. Biol. Bundesanst. Berlin-Dahlem*, Heft 80, 129—136.
- — und KÖHLER, E., 1952: Elektronenmikroskopische Untersuchungen am Kartoffel-X- und Tabakmosaik-Virus. *Zeitschr. Naturforschung* **7 b**, 598—600.
- — und PAUL, H. L., 1955: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über Kartoffelviren I. Vermessungen an Teilchen des Kartoffel-X-Virus. *Biochim. et Biophys. Acta* **16**, 343—345.
- BRANDES, J. und QUANTZ, L., 1955: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über Buschbohnenviren (*Phaseolus*-Virus 1 und *Phaseolus*-Virus 2). *Naturwissenschaften* **42**, 588.
- COUCH, H. B. and GOLD, H., 1954: Rod-shaped particles associated with lettuce virus. *Phytopathology* **44**, 715—717.
- JOHNSON, J., 1951: Virus particles in various plant species and tissues. *Phytopathology* **41**, 78—93.
- KÖHLER, E., 1940: Weitere Studien über die Vira der Y-Gruppe. *Phytopath. Z.* **12**, 480—489.

- PAUL, H. L. und BODE, O., 1955: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über Kartoffelviren II. Vermessung der Teilchen von drei Stämmen des Rattlevirus. *Phytopath. Z.* **24**, 341—351.
- SCHRAMM, G., 1952: Über die Größe und Gestalt des Kartoffel-Y-Virus. *Z. Naturforschg.* **7 b**, 513—518.
- SKOTLAND, C. B., 1953: Fundamental studies of two plant viruses. Ph. D. Thesis Univ. of Wisconsin.
- WETTER, C. und BRANDES, J., 1955: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über Gestalt und Größe des Kartoffel-S-Virus. *Naturwissenschaften* **42**, 100—101.
- — und — —, 1956: Untersuchungen über das Kartoffel-S-Virus. *Phytopath. Z.* **26**, 81—92.
- WILLIAMS, R. C., 1954: Electron microscopy of viruses. *Advances in virus research*, Vol. II, 184—239.
- ZIMMER, K. und BRANDES, J., 1956: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über das Rübenmosaik-Virus. *Phytopath. Z.* **26**, 439—442.

## A propos de *Lophodermium pinicola* Tehon

par

CH. TERRIER

Dans le dernier volume de Sydowia, PETRAK (1955, p. 525) prétend que l'espèce du genre *Lophodermium* qui croît sur les aiguilles de *Pinus* et qui est le plus généralement connue sous le nom de *Lophodermium pinastri* (Schr. ex Fr.) Chevallier doit s'appeler *L. pinicola* Tehon. Ce faisant, le mycologue de Vienne adopte le point de vue de TEHON (1935, p. 288 et 310), point de vue qui est complètement erroné, ainsi que l'a déjà fait remarquer NANNFELDT (1936, p. 34). En effet, TEHON (l. c. p. 288) écrit: „CHEVALLIER, in transferring it (*Hysterium pinastri*) to *Lophodermium* appears to have had at hand exemplary material on *Picea*. This is now well recognised as separate from all forms on *Pinus*. What purports to be CHEVALLIER's type material is distributed in No. 1661 of ROUMEGUÈRE's *Fungi gallici exsiccati*. . . . It appears that CHEVALLIER's type defines the name, *L. pinastri*, as applicable to the fungus on *Picea* rather than to those on *Pinus*". Cette interprétation est absolument fausse, ainsi que le prouvent les faits suivants:

1. CHEVALLIER (1826, p. 436) cite comme échantillon de *L. pinastri* celui distribué en 1810 par MOUGEOT et NESTLER (Stirp. crypt. vogeso-rhen. No 76); il porte l'inscription: „*Hysterium pinastri* Schrader, Diar. bot., in foliis emortuis Pinorum"; le champignon s'y trouve effectivement sur *Pinus silvestris* L.

2. CHEVALLIER n'a pas pu avoir en mains, en 1826, le matériel distribué en 1882 par ROUMEGUÈRE (F. gallici exs., cent. 17, No 1661), avec la mention *Reliquiae libertianae*.

3. Si *Hysterium pinastri* avait figuré dans les *Plantae cryptogamae Arduennae* de LIBERT, ce n'eût été, en tous cas, qu'après la parution de l'ouvrage de CHEVALLIER, puisque le premier fascicule de cet exsiccata a paru en 1830.

4. L'échantillon de ROUMEGUÈRE (No 1661) contient, tant le spécimen de l'herbier d'Upsal examiné par NANNFELDT que celui de l'herbier de Neuchâtel, des aiguilles de *Pinus* et non de *Picea* ou d'*Abies*; l'étiquette porte l'inscription: „sur les aiguilles des Pins", ce qui est exact en



ce qui concerne l'échantillon neuchâtelois puisqu'il renferme, d'une part, des aiguilles de *Pinus silvestris* L. avec *L. pinastri* (Schrader ex Fr.) Chev. et, d'autre part, des aiguilles de *Pinus Strobus* L. avec *Hypoderma Desmazierii* Duby; donc il est certain que ROUMEGUÈRE entendait bien le champignon sur *Pinus* (en français: pin) et non celui sur *Picea* (en français: épicéa) ou sur *Abies* (en français: sapin).

5. Si ROUMEGUÈRE a inscrit sur l'étiquette de son échantillon 1661: „(Type)“, ce n'est certainement pas qu'il pensait désigner par là le matériel-type dont avait disposé CHEVALLIER, mais bien la forme *pinastri* typique, par opposition à *Lophodermium pinastri forma b minor* Westendorp, qu'il avait distribué antérieurement (1879, F. sel. gall. exs. No 456).

6. TEHON (l. c., p. 286) écrit à propos du spécimen-type: „Not in existence. FRIES cites Scl. suec. exs. No 50.“ Or, ce type existe dans l'exsiccata du mycologue suédois mais sous No 30, et il y est sur aiguilles de *Pinus silvestris* L. Il y a effectivement une faute d'impression dans le Syst. mycol. 2, p. 587 (1823).

Les faits rappelés ci-dessus montrent clairement que, contrairement à l'assertion de PETRAK, il n'y a pas lieu du tout d'abandonner complètement le nom donné par CHEVALLIER parce qu'il devrait prêter à confusion. Ce n'est pas CHEVALLIER, ni les auteurs subséquents, ni même l'application des „Règles de la nomenclature botanique“ qui sont à l'origine de cette confusion, mais bien TEHON.

En conséquence, *Lophodermium pinicola* Tehon doit être réduit au rang de synonyme de *Lophodermium pinastri* (Schrader ex Fries) Chevallier, tout comme *Lophodermellina pinastri* (Chevallier) von Höhnelt sensu TEHON (1935, p. 308) doit prendre place parmi les synonymes de *Lophodermium piceae* (Fuckel) v. Höhn.

### Zusammenfassung

Nach PETRAK (1955, S. 525) muß der Kiefernadelnschütterreger *Lophodermium pinastri* (Schrader ex Fr.) Chevall. in Wirklichkeit *Lophodermium pinicola* Tehon heißen. Es wird jedoch gezeigt, daß TEHON (1935) nicht berechtigt ist, CHEVALLIERS Namen zu ändern. CHEVALLIER übertrug (1826) *Hysterium pinastri* Schrader in die Gattung *Lophodermium* auf Grund des von MOUGEOT und NESTLER, im Jahre 1810, ausgegebenen Exsikkats (Stirp. crypt. vogeso-rhen. Nr. 76) und nicht, wie TEHON es annimmt, auf Grund von ROUMEGUÈRES Material, das erst im Jahre 1882 veröffentlicht wurde. Da sich der Pilz, sowohl im zitierten Exsikkat von MOUGEOT und NESTLER wie in demjenigen von FRIES (Scler. suec. exs. Nr. 30, nicht 50, wie es in Syst. mycol. 2, S. 587, falsch gedruckt ist) auf Nadeln von *Pinus silvestris* L. befindet, gibt CHEVALLIERS Name absolut keinen Anlaß zu irgendwelchen Irrtümern und bleibt vollkommen gültig. *Lophodermellina pinicola* Tehon ist also als Synonym von *Lophodermium pinastri* (Schrader ex Fr.) Chevallier zu betrachten.

## Ouvrages cités

- CHEVALLIER, F. F., 1826: Flore générale des environs de Paris, selon la méthode naturelle. 1, 674 p. 18 pl., Paris.
- FRIES, E., 1819: Scleromyceti sueciae. Decad. I—IV. Lundae.
- —, 1822—23: Systema mycologicum 2: 275—620. Lundae et Gryphiswaldiae.
- LIBERT, M.-A., 1830: Plantae cryptogamae Arduennae. Fasc. 1.
- LUNDELL, S. et NANNFELDT, J. A., 1936: Fungi exsiccati suecici praesertim upsalienses. Fasc. VII—VIII (Nr. 301—400), 40 p. Uppsala.
- MOUGEOT, J. B. et NESTLER, C., 1810: Stirpes cryptogamae vogeso-rhenanae. Fasc. 1. Bruyerii vogesorum.
- NANNFELDT, J. A., 1936: voir LUNDELL, S. et NANNFELDT, J. A.
- PETRAK, F., 1955: Über *Phacidium infestans* Karst., einen gefährlichen Parasiten der Zirbelkiefer und einige andere in seiner Gesellschaft wachsende Pilze. Sydowia 9, 518—526.
- ROUMEGUÈRE, C., 1879: Fungi selecti gallici exsiccati. Cent. 5.
- —, 1882: Fungi gallici exsiccati. Cent. 17.
- TEHON, L. R., 1935: A monographic rearrangement of *Lophodermium*. Illinois biol. Monographs 13, 233—381.



## Besprechungen

Müller, Paul, DDT. Das Insektizid Dichlordiphenyltrichloräthan und seine Bedeutung. Bd. I. Birkhäuser Verlag, Basel 1955. In Ganzleinen: Schw. Fr. oder DM 37,50; broschiert 33,50.

Die Entdeckung der insektiziden Wirkung des DDT durch Dr. P. MÜLLER von der I. R. GEIGY (Basel) im Jahre 1940 bedeutete einen Markstein in der Geschichte der Insektizidchemie und in der Schädlingsbekämpfung. Dieses Ereignis hatte einerseits einen bewundernswerten Fortschritt in der Erforschung der synthetischen organischen Verbindungen zur Folge. Andererseits öffnete es neue Wege für die Bekämpfung von Insekten.

Die vielen Hoffnungen, die man anfänglich an das DDT geknüpft hatte, konnten in der Folge nicht restlos erfüllt werden. Auch mußte es auf dem einen oder anderen Anwendungsgebiet teilweise oder ganz vor anderen synthetischen Verbindungen weichen. Dies ändert aber nichts an der Tatsache, daß das DDT auch heute noch einen wichtigen Faktor bei der Bekämpfung zahlreicher Insekten darstellt. Es ist von allen modernen Insektiziden am meisten studiert worden: sowohl in bezug auf seine Anwendungsmöglichkeiten als auch hinsichtlich der toxischen Wirkung.

Solche Überlegungen werden Dr. MÜLLER bewogen haben — nachdem er sich die Mitarbeit einiger namhafter Wissenschaftler gesichert hatte —, an die Ausarbeitung einer drei Bände umfassenden Monographie über dieses wichtige Produkt heranzutreten. Der erste Band dieser Arbeit ist kürzlich erschienen.

Einleitend skizziert Dr. MÜLLER die Geschichte des DDT und die Umstände, welche zu der Entdeckung geführt haben, die ihm den Nobelpreis eintrug. Im anschließenden ersten Abschnitt behandelt er die physikalischen und chemischen Eigenschaften, wobei die verschiedenen Methoden der Analyse, der Synthese und der Herstellung erwähnt werden. Der Autor schließt mit Betrachtungen über die DDT-Reihe und deren verwandte Verbindungen unter tabellarischer Angabe der Strukturformeln.

Prof. WIGGELSWORTH (Cambridge) erörtert im folgenden Kapitel in einer interessanten Abhandlung die Art der DDT-Wirkung auf die Insekten (Durchdringung der Kutikula, Verteilung im Körper, Wirkung auf das Nervensystem, die Enzyme und den Metabolismus). Auch das Problem der Insektizidresistenz wird behandelt.

Im dritten Abschnitt berichtet Dr. M. E. BERNFUS (Wien) über Erfahrungen mit dem DDT im Vorratsschutz, namentlich beim Getreide.

Der vierte Abschnitt über den Textilschutz mit DDT-Insektiziden stammt aus der Feder von Dr. O. WÄLCHLI (EMPA St. Gallen). Der Autor geht zunächst auf die biologischen Eigenheiten der wichtigsten keratinfressenden Arten ein. Anschließend befaßt er sich mit der Wirkungsweise von DDT auf die Schädlinge. Unter den im Handel befindlichen DDT-Produkten gewährleisten zwar nicht alle einen derart dauerhaften Wollschutz wie z. B. Mitin FF und Eulan CN. Sie haben aber trotzdem ihre Berechtigung, vor allem im Hausgebrauch, infolge der Einfachheit ihrer Anwendung.

Das Buch schließt mit den Ausführungen von Prof. BUTOWITSCH (Stockholm) über die Anwendung von DDT in der Forstwirtschaft. Der Leser findet hier eine reichliche Dokumentation über das Verhalten verschiedener Forstinsekten gegenüber dem DDT. Der Autor berichtet über die Ergebnisse von Bekämpfungsmaßnahmen gegen Forstschädlinge in Amerika und Europa sowie über die Anwendungsmöglichkeiten der im Handel befindlichen Präparate.

Das DDT ist gegenwärtig noch das häufigste Insektizid, das bei Großflächenbehandlungen gegen wichtige Forstschädlinge, so die Lepidopteren-Raupen, wie auch gegen Rinden- und Holzinsekten, angewendet wird. Es gelangt entweder als Pulver- oder Spritzmittel zum Einsatz. Die verschiedenen Behandlungsarten (mittels Zerstäubern, Nebelblasern, Flugzeugen) sowie die für den Erfolg nötigen Bedingungen werden eingehend beschrieben. — Auf Grund der bisherigen Kenntnisse erörtert der Autor auch das Problem der Nebenwirkungen von Bekämpfungsmaßnahmen auf die gesamte Waldbiozönose.

Die wertvolle Dokumentation, die jedem Abschnitt dieses ersten Bandes eigen ist, wird noch durch ein ziemlich vollständiges Literaturverzeichnis unterstrichen. Dieses Buch gehört in die Bibliothek aller Institute und Laboratorien, die sich mit Problemen der Insektizidbekämpfung befassen.

P. BOVEY, Zürich

*Jetzt in Einzelbänden lieferbar!*

# HANDBUCH DER LANDWIRTSCHAFT

2. Auflage in fünf einzeln käuflichen Bänden

Unter Mitwirkung von 57 Wissenschaftlern herausgegeben von den Professoren

Dr. TH. ROEMER  
Halle (Saale)

Dr. A. SCHEIBE  
Gießen

Dr. J. SCHMIDT  
Hohenheim

Dr. E. WOERMANN  
Göttingen

## Band I: Ackerbaulehre

1952. 654 Seiten mit 130 Textabbildungen. Ganzleinen DM 66,—

Boden als Standort der Pflanzen · Mikrobiologie des Bodens · Klima und Witterung  
Meliorationen · Fruchtwechsel · Bodenbearbeitung · Unkrautbekämpfung · Ernährung  
und Düngung der Pflanzen · Gründüngung · Saat- und Pflanzgut · Pflanzenkrankheiten

## Band II: Pflanzenbaulehre

1953. 794 Seiten mit 184 Textabbildungen. Ganzleinen DM 79,—

Getreide der gemäßigten Zone · Mais und Hirse · Getreidequalität, Brot und Nähr-  
mittel · Kartoffelbau · Rübenbau · Hülsenfruchtbau · Ölfruchtbau · Feldfutter-  
und Zwischenfruchtbau · Wiesen und Weiden · Hanf · Faserleinbau · Tabakbau  
Heil- und Gewürzpflanzenbau · Obstbau · Feldgemüsebau · Hopfenbau

## Band III: Allgemeine Tierzuchtlehre

1952. 443 Seiten mit 82 Textabbildungen  
Ganzleinen DM 46,—

## Band IV: Besondere Tierzuchtlehre

1953. 548 Seiten mit 245 Textabbildungen  
Ganzleinen DM 60,—

## Band V: Wirtschaftslehre des Landbaues

1954. 792 Seiten mit 34 Textabbildungen  
Ganzleinen DM 73,—

Preis des Gesamtwerkes (Ganzleinen): DM 296,—, bei Teilzahlung DM 325,—

Das „Handbuch der Landwirtschaft“ ist das umfassendste deutsche Werk der Landwirt-  
schaft, das in der Qualität seines Inhalts und seiner erstklassigen Ausstattung nicht seines-  
gleichen hat. Es gibt eine vollständige, allgemeinverständlich gehaltene, systematische Ein-  
führung zur erfolgreichen Führung eines landwirtschaftlichen Betriebes, die auf den neuesten  
wissenschaftlichen Forschungen und praktischen Erfahrungen des In- und Auslandes beruht.

*„Die Landwirtschaft hat durch die freudige Aufnahme, die sie dem Werk bereitet hat,  
gezeigt, daß sie ein solches Werk zu schätzen weiß, das ihr in wissenschaftlicher Voll-  
ständigkeit, in einer der Praxis entsprechenden, leicht eingehenden Darstellung und einer  
vorbildlichen Ausstattung die technischen und wirtschaftlichen Grundlagen ihrer Berufs-  
arbeit vermittelt. ... Das Werk bedeutet einen bisher nicht erreichten Gipfel der  
Landwirtschaftslehre.“*

VERLAG PAUL PAREY / BERLIN UND HAMBURG



# Handbuch der Pflanzenkrankheiten

Begründet von  
PAUL SORAUER

In sechs einzeln käuflichen Bänden herausgegeben von

Prof. Dr. Dr. h. c. O. APPEL †  
Geh. Reg.-Rat, Präsident a. D.  
der Biologischen Reichsanstalt  
für Land- und Forstwirtschaft

Prof. Dr. Dr. h. c. H. BLUNCK  
ehem. Direktor  
des Instituts für Pflanzenkrankheiten  
der Universität Bonn

Prof. Dr. H. RICHTER  
Präsident der Biologischen  
Bundesanstalt für Land- und  
Forstwirtschaft

## II. Band: Die Virus- und bakteriellen Krankheiten

6., neubearbeitete Auflage in 2 Lieferungen

1. Lieferung

### Die Viruskrankheiten

Bearbeitet von Ob.-Reg.-Rat Dr. E. Köhler und Prof. Dr. M. Klinkowski

1956, 786 Seiten mit 326 Abbildungen, Ganzleinen DM 150,—

*Soeben erscheint:*

2. Lieferung

### Bakterielle Krankheiten

#### Bakteriosen einschließlich Streptomykosen

Bearbeitet von Ob.-Reg.-Rat a. D. Dr. C. STAPP, Braunschweig

575 Seiten mit 179 Abbildungen, Ganzleinen DM 124,—

Die Lieferungen sind einzeln käuflich

Bei Abnahme beider Lieferungen ermäßigt sich der Einzelpreis um 10 %

VERLAG PAUL PAREY / BERLIN UND HAMBURG

---

Verlag: Paul Parey, (1) Berlin SW 68, Lindenstr. 44-47, Tel. 61 44 68/69, Herausgeber: Prof. Dr. E. Gäumann, Zürich 6, Universitätsstr. 2, Prof. Dr. M. Klinkowski, Aschersleben, Ermslebener Str. 52, und Prof. Dr. H. Richter, Berlin-Dahlem, Königin-Luise-Straße 19. Printed in Germany. Druck von A. W. Hayn's Erben, Berlin SO 36. Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des auszugsweisen Nachdrucks und der photomechanischen Wiedergabe vorbehalten. — Erscheinungsweise: Jährlich etwa 10—12 Hefte (4 Hefte = 1 Band).